

Aus dem Deutschen Herzzentrum Berlin

DISSERTATION

Wirkung der AT2-Überexpression auf Collagen I α 2-mRNA-Gehalt und Migration porciner kardialer Fibroblasten

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Daniel Kaup

aus Lemgo

Dekan: Prof. Dr. Joachim W. Dudenhausen

Gutachter:

1. Frau Prof. Dr. Regitz-Zagrosek
2. Herr Prof. Dr. Philipp
3. Herr Prof. Dr. Bachmann

Datum der Promotion: 11. April 2003

Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der humanen AT2-Rezeptorexpression und -stimulation auf den Collagen I alpha 2-mRNA-Gehalt und die Migration von porcinen kardialen Fibroblasten untersucht, um die Frage zu klären, ob AT2-Rezeptoren in kultivierten kardialen Fibroblasten AT1-antagonistische antifibrotische und migrationshemmende Effekte auf den Collagen I alpha 2-mRNA-Gehalt bzw. die Migration ausüben. Um die Funktion der AT2-Rezeptoren in der Zellkultur untersuchen zu können, wurde die AT2-cDNA durch adenovirale Transduktion in die Fibroblasten übertragen und so der AT2-Rezeptor überexprimiert. Mittels RT-PCR wurden die relativen Änderungen im Collagen I alpha 2-mRNA-Gehalt in TGF-beta1- bzw. TGF-beta1 plus Ang II-stimulierten Fibroblasten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bestimmt. Alle Werte wurden auf ein Referenzgen (beta-Actin) bezogen. Die AT2-Stimulation änderte den relativen Collagen I alpha 2-mRNA-Gehalt der Fibroblasten nicht signifikant gegenüber den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten.

In der modifizierten Boyden-Kammer wurde der AT2-vermittelte Effekt von Ang II, hPDGF-BB sowie der Kombination beider Stoffe auf die Migration untersucht. Die alleinige Stimulation von AT2-Rezeptoren mit Ang II verhinderte die Migration gegenüber nichttransduzierten Fibroblasten. In Kombination mit hPDGF-BB änderte Ang II die Migration in AT2-überexprimierenden Fibroblasten nicht gegenüber den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten. Bei ausschließlicher Stimulation durch hPDGF-BB wurde aber in AT2-exprimierenden Fibroblasten eine signifikant geringere Migration als in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten festgestellt.

Die zugrunde liegende Hypothese, dass AT2-Expression und Stimulation den relativen Collagen I alpha 2-mRNA-Gehalt hemmt, konnte in den vorliegenden Experimenten nicht bestätigt werden. Dies ließ keine inhibitorische AT2-vermittelte Wirkung von Ang II im Bezug auf den TGF-beta1-induzierten Collagen I alpha 2-mRNA-Gehalt erkennen. Dagegen führte die Ang II-Stimulation überexprimierter AT2-Rezeptoren zu einer verringerten Migration und vermittelte so einen AT1-antagonistischen Effekt.

Schlagwörter:

Angiotensin II, AT2, Collagen I alpha 2-mRNA, Migration

Abstract

In this work the influence of expression and stimulation of the human AT2 receptor on Collagen I alpha 2-mRNA-content and migration of porcine cardiac fibroblasts was tested to clarify the question if AT2 receptors promote AT1 antagonistic antifibrotic and antimigratory effects on collagen I alpha 2-mRNA content and migration. To examine the AT2 receptor function in the cell culture AT2 cDNA was transferred into fibroblasts by adenoviral transduction and the AT2 receptor was overexpressed. Through the use of RT-PCR the relative changes in collagen I alpha 2-mRNA content in TGF-beta1 stimulated and TGF-beta1 plus Ang II stimulated fibroblasts were assayed and compared to the unstimulated control. All values were referred to a reference gene (beta-actin). Stimulation of AT2 receptors did not change the relative collagen I alpha 2-mRNA content of the fibroblasts significantly compared to antisense-(Ad5TA2) transduced fibroblasts.

In the modified Boyden-chamber the AT2 mediated effect of Ang II, hPDGF-BB and the combination of both on migration was assessed. The stimulation of AT2 receptors with Ang II inhibited migration compared to nontransduced fibroblasts. In combination with hPDGF-BB Ang II did not change the migration in AT2 overexpressing fibroblasts compared to antisense-(Ad5TA2)-transduced fibroblasts. In the case of exclusive stimulation of AT2-expressing fibroblasts with hPDGF-BB a significantly lower migration was found compared to antisense-(Ad5TA2)-transduced fibroblasts.

The underlying theory that AT2 expression and stimulation inhibits the relative collagen I alpha 2-mRNA content could not be confirmed in this work. This did not reveal an inhibitory AT2 mediated effect of Ang II in respect to the TGF-beta1 induced collagen I alpha 2-mRNA content. In contrast to that Ang II stimulation of overexpressed AT2 receptors led to a decreased migration and mediated an AT1 antagonistic effect.

Keywords:

Angiotensin II, AT2, Collagen I alpha 2-mRNA, Migration

Publikationen

Warnecke C., Kaup D., Marienfeld U., Poller W., Yankah C., Gräfe M., Fleck E., Regitz-Zagrosek V.: Adenovirus-mediated overexpression and stimulation of the human angiotensin II type 2 receptor in porcine cardiac fibroblasts does not modulate proliferation, collagen I mRNA expression and ERK1/ERK2 activity, but inhibits protein tyrosine phosphatases, *Journal of Molecular Medicine*; 2001; 79(9): S. 510-521

Warnecke C., Kaup D., Marienfeld U., Poller W., Regitz-Zagrosek V.: Einfluß der Überexpression des humanen Angiotensin II Typ 2 Rezeptors mittels eines adenoviralen Vektors auf Collagen I-mRNA Expression und Proliferation von porcinen kardialen Fibroblasten, *Zeitschrift für Kardiologie*; 2000; 89, Supplement 5: S. 91 (Abstract 552)

Warnecke C., Kaup D., Poller W., Yankah C., Gräfe M., Regitz-Zagrosek V.: Adenovirus-Mediated Overexpression of the Human Angiotensin II Type 2 Receptor in Porcine Cardiac Fibroblasts Does Not Modulate Cell Functions Related to Fibrosis, but Inhibits Phosphotyrosine Phosphatase Activity, *Hypertension*; 2001; 38(3): S. 492 (Abstract P16)

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	1
1.2	Das kardiale Renin-Angiotensin-System	4
1.2.1	Kardiale AT1-Rezeptoren	4
1.2.2	Kardiale AT2-Rezeptoren	5
1.3	Physiologische und pathophysiologische Funktionen kardialer Fibroblasten	6
1.4	Fragestellung	7
2	METHODEN	9
2.1	Zellkultur	10
2.1.1	Isolierung porciner Fibroblasten	10
2.1.2	Kultivierung porciner Fibroblasten	11
2.1.3	Identifizierung von Fibroblasten in der Zellkultur	12
2.2	Überexpression des humanen AT2-Rezeptors	12
2.2.1	Herstellung und Charakterisierung der verwendeten adenoviralen Vektorkonstrukte Ad5AT2 und Ad5TA2	13
2.2.2	Durchführung der Transduktion porciner Fibroblasten mittels adenoviraler Vektoren	15
2.2.3	Bestimmung der Transduktionseffizienz mit Hilfe eines adenoviralen β -Galaktosidase-Expressionsvektors (Ad5LacZ) und X-Gal Einzelzellfärbung	15
2.2.4	Nachweis der Expression des Angiotensin II-Rezeptoren durch Messung der [125 I]-(Sar1, Ile8)-Ang II-Bindung	16
2.3	RT-PCR-Nachweis und relative Quantifizierung von spezifischen RNA-Transkripten in heterogenen Pools von RNAs	17
2.3.1	RNA-Extraktion	19
2.3.2	Bestimmung von Reinheit und Konzentration der extrahierten RNA	20
2.3.3	Reverse Transkription	20
2.3.4	Polymerasekettenreaktion	21
2.3.5	Agarosegelelektrophorese und relative Quantifizierung der RT-PCR-Produkte	22
2.3.6	Externe Standardisierung	23
2.4	Migrationsexperiment	24
2.5	Statistik	27

3	ERGEBNISSE	28
3.1	Validierung der Methoden	28
3.1.1	Isolierung, Kultivierung und Nachweis von Fibroblasten	28
3.1.2	Feststellung der Transduktionseffizienz mittels eines adenoviralen β -Galaktosidasevektors (Ad5LacZ)	30
3.1.3	Expression von Ang II-Rezeptoren in nativen und transduzierten Fibroblasten	32
3.2	Semiquantitative Bestimmung von Collagen I α 2-mRNA	35
3.2.1	Validierung der Agarosegelelektrophorese zur semiquantitativen Bestimmung der Collagen I α 2-mRNA	35
3.2.2	Optimierung der RT-PCR durch Auswertung von Zyklusprofilen	35
3.2.3	Relative Quantifizierung des Collagen I α 2-mRNA-Gehalts in Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten, stimulierten Fibroblasten	38
3.3	Migration porciner kardialer Fibroblasten	41
3.3.1	Validierung des Migrationsexperiments durch Stimulation nichttransduzierter Fibroblasten mit hPDGF-BB	41
3.3.2	Migration nichttransduzierter, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit hPDGF-BB	43
3.3.3	Migration nichttransduzierter, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II	45
3.3.4	Migration nichttransduzierter, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II und hPDGF-BB	48
4	DISKUSSION	51
4.1	Zusammenfassung der Ergebnisse	51
4.2	Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur	52
4.2.1	Semiquantitative Bestimmung der Collagen I α 2-mRNA	52
4.2.2	Migration der porcinen kardialen Fibroblasten	58
4.3	Bedeutung für zukünftige Untersuchungen	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	66

Abkürzungsverzeichnis

[¹²⁵ I]-(Sar1, Ile8)-Ang II	Radioaktiv markierter, rezeptorsubtyp-unspezifischer Ligand von Angiotensin II Rezeptoren
3T3	Mauszelllinie fibroblastenähnlicher Morphologie
ACE	„Angiotensin converting enzyme“
Ad5AT2	Adenoviraler Expressionsvektor für den humanen AT2-Rezeptor (enthält die proteinkodierende Region des AT2-Gens)
Ad5TA2	Adenoviraler Expressionsvektor das die proteinkodierende Region des AT2-Gens in der nicht-funktionellen „Antisense“-Orientierung (entgegengesetzte Orientierung) enthält; „AT2-antisense-Kontrollvektor“
Ang II	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
AT2	Angiotensin II Rezeptor Typ 2
ATC	„Adult connective tissue cells“, Bindegewebszellen aus Haut adulter Mäuse
ATR	Angiotensin II Rezeptor
AUC	„Area under the curve“, Fläche unter der Kurve
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin, „Albumin Bovine Fraktion V Solution“
bzw.	beziehungsweise
C	Celsius
ca.	zirka
cDNA	„Complementary DNA“, „copy DNA“, Desoxyribonucleinsäure-Kopie eines mRNA-Moleküls
cm	Zentimeter
CMV	Zytomegalievirus
cpm	„Counts per minute“, Anzahl gemessener Impulse pro Minute
d.h.	das heißt
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	„Deoxyribonucleic acid“, Desoxyribonucleinsäure
dNTP	2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	„Extracellular signal regulated kinase“, extrazellulär signalregulierte Kinase
et al.	„et alii“, und andere
evtl.	eventuell
FKS	Fetales Kälberserum
g	Gramm
h	Stunde
hPDGF-BB	„Human platelet derived growth factor BB-Homodimer“

HPLC	„High performance liquid chromatography“, Hochdruck-Flüssigkeits-Chromatographie
HUVEC	„Human Umbilical Vein Endothelial Cells“, Endothelzellen aus menschlicher V. umbilicalis
kDa	Kilo-Dalton
KO	Kontrollansatz
l	Liter
μ	Mikro
m	Meter
m.o.i	„Multiplicity of infection“, Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle
MAPK	„Mitogen activated protein kinase“, mitogenaktivierte Proteinkinase
min	Minute(n)
MKP-1	„Mitogen activated protein kinase (MAPK) phosphatase-1“
MMP	Matrix Metalloproteinase
mRNA	„Messenger RNA“, Boten-Ribonucleinsäure
MW	Mittelwert
OD ₂₆₀ , OD ₂₈₀	optische Dichte bei Wellenlängen von 260 nm bzw. 280 nm
ORF	„Open reading frame“, offener Leserahmen; proteinkodierende Region
PBS	„Phosphate buffered saline“, Phosphatpufferlösung
PC12W	Ratten-Phäochromozytom-Zellen
PLC β	Phospholipase C β
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	„Ribonucleic acid“, Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
s	Sekunde(n)
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHP-1	„Src-Homologyregion 2 (SH2) containing tyrosine Phosphatase-1“
TGF-β ₁	„Transforming growth factor-β ₁ “
TIMP	„Tissue inhibitor of metalloproteinase“
U	„Unit“
V	Volt
v/v	Volumen/Volumen
vs.	versus
VT	Volumenteil
x g	-fache Gravitation
X-Gal	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl-β-D-galactosid

1 Einleitung

1.1 Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System steuert durch Angiotensinrezeptoren (ATR) Gefäßtonus, Blutdruck und Wachstumsprozesse und interagiert mit der Elektrolytaufnahme, dem endokrinen und parakrinen System, der Aldosteronproduktion und der Katecholaminfreisetzung (Übersicht in [83]). Bei verringertem Blutfluß in den Nieren setzen juxtaglomeruläre Zellen Renin ins Blut frei, das die Umwandlung des in der Leber gebildeten Angiotensinogens zu Angiotensin I (Ang I) katalysiert. Auf der Oberfläche von Endothelien befindet sich „angiotensin converting enzyme“ (ACE), das Ang I in Angiotensin II (Ang II) umwandelt (Übersicht in [110]). Daneben kommen Angiotensin II-produzierende Komponenten des RAAS in Gefäßen, in den Nebennieren und dem Herzen vor (Übersicht in [22] [65] [79]). Ang II wirkt auf die glatte Gefäßmuskulatur als ein potenter Vasokonstriktor. Über das sympathische Nervensystem beeinflusst es die Kontraktilität des Herzens und die Herzfrequenz. In den Nebennierenrinden bewirkt Ang II die Synthese von Aldosteron, was in den Nieren zu einer verstärkten Natriumionen- und Wasserrückresorption führt. Weiterhin erhöht Ang II das Durstgefühl, stimuliert die Sekretion von Antidiuretischem Hormon (Übersicht in [4] [105] [110]) und ist für einige Zelltypen (glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und Kardiomyozyten) ein wachstums- bzw. hypertrophieinduzierender Faktor.

Beim Menschen sind mehrere Angiotensinrezeptortypen bekannt, von denen der AT1-Rezeptorsubtyp und, in weitaus geringerem Umfang, der AT2-Rezeptortyp am Besten charakterisiert sind (Übersicht in [105] [110]). Die Funktion von AT2 ist bis heute nicht geklärt. Beide Rezeptoren verfügen über eine ähnliche Affinität zu Angiotensin II (Übersicht in [81]) und beide Rezeptortypen sind G-Protein-gekoppelte Rezeptoren mit sieben transmembranären Domänen (Übersicht in [105]), wobei für AT2 eine G-Proteinkopplung nicht sicher nachgewiesen werden konnte. Dabei weisen AT1- und AT2-Rezeptoren eine Aminosäuresequenzhomologie von lediglich 34% auf [45]. Unterschiede zwischen beiden Rezeptoren bestehen in Bezug auf ihre Expression in den verschiedenen Organen, die subtypspezifische Bindung von Liganden, die Signaltransduktionswege und die von den Rezeptoren vermittelten Wirkungen. Durch die selektive Bindung des Antagonisten Losartan und durch verminderte Ligandenbindung in Anwesenheit des Reduktionsmittels Dithiothreitol (DTT) können AT1-Rezeptoren und AT2-Rezeptoren unterschieden werden [13]. AT1 ist beim Erwachsenen der dominierende Rezeptortyp in vielen Geweben. Besonders ausgeprägt kommt AT1 in Nieren, Arterien, Nebennieren, im Myokard, im zentralen und peripheren Nervensystem,

in Fortpflanzungsorganen (Übersicht in [45] [103]) und der Leber [65] vor. Zu den von AT1 vermittelten Wirkungen zählen: Vasokonstriktion, Aldosteronsekretion, Hypertrophie, Zellwachstum, Katecholaminfreisetzung [65] und renale Reabsorption von Natriumionen [45]. Die Signaltransduktion der AT1-Rezeptoren verläuft über das G-Protein Gq und Phospholipase C β (PLC β), die 1,4,5-Inositol-trisphosphat (IP₃) und Diacylglycerol (DAG) freisetzt, was zu einem Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und der Aktivierung der Proteinkinase C führt. Die Proteinkinase C führt durch Aktivierung der MAPK-Kinase (MEK) zur Phosphorylierung und damit zur Aktivierung der MAP-Kinasen ERK1 („extracellular signal regulated kinase“) und ERK2 [91] (Übersicht in [45] [7] [61]). MAP-Kinasen sind zytosolische Serin/Threonin-Kinasen, die in ruhenden Zellen von diversen Wachstumsreizen aktiviert werden und als eine Verbindungsstelle mehrerer Signaltransduktionswege zwischen Zellmembran und -kern angesehen werden [7]. Ein anderer Aktivierungsweg der MAPK durch AT1 verläuft unabhängig von G-Proteinen über den Ras-Raf-MAPK-Signaltransduktionsweg (Übersicht in [45]) und ähnelt damit der Signaltransduktion der Rezeptortyrosinkinasen, wie z.B. dem PDGF-Rezeptor. In beiden Fällen kommt es durch die aktivierten MAPK zur Induktion und Aktivierung der Protoonkogene c-fos und c-jun [53] [112]. C-jun und c-fos sind Transkriptionsfaktoren, die maßgeblich beteiligt sind an der Expression vieler proliferation- und „remodeling“-induzierender Gene [53]. Auch konnte gezeigt werden, dass der MAPK-Signaltransduktionsweg essenziell ist für die PDGF-induzierte Migration von glatten Gefäßmuskelzellen [32]. Weiterhin aktiviert Ang II über den AT1-Rezeptor die MAPK p38 (wahrscheinlich über reaktive Sauerstoffmetaboliten, ROS – „reactive oxygen species“), die JNK (Jun-N-terminal Kinase) und den JAK/STAT- („Janus kinase/signal transduction and activation of transcription“)-Signaltransduktionsweg, der auch von vielen Zytokinen aktiviert wird. Zusammengefasst ist die Signaltransduktion des AT1-Rezeptors ausgesprochen komplex und umfasst sowohl die für Sieben-transmembranäre Rezeptoren typischen G-Protein-gekoppelten, wie auch G-Protein-unabhängige Signaltransduktionswege.

AT2-Rezeptoren können durch die selektive Bindung der Liganden CGP42112A und PD123319 identifiziert werden [43] [44] [49] [65] [101] [103] [105]. AT2-Rezeptoren werden vor allem in der Fetalzeit hoch exprimiert, was für eine Funktion in der Fetalentwicklung spricht. Sofort nach der Geburt nimmt die AT2-Expression schnell ab und bleibt mit tierartspezifischen Unterschieden in niedrigen Konzentrationen in Nebenniere, Herz, Aorta, Niere und einigen Hirnregionen [8], Myometrium, Ovar, Testis und Lunge [65] bestehen. Experimente mit „knock-out“-Mäusen zeigen eine normale Entwicklung der Tiere, jedoch ist die Durstentwicklung nach

Wasserentzug und der Explorationstrieb verringert. Das Fehlen der AT2-Rezeptoren bewirkt einen signifikant erhöhten Blutdruck und einen verstärkten Blutdruckanstieg nach Ang II-Infusion [35] [41]. Senbonmatsu et al. beschreiben in „AT2-knock-out“-Tieren eine verminderte linksventrikuläre Hypertrophie nach Druckbelastung [94]. AT2 Überexpression geht mit einer Verringerung des arteriellen Widerstands und negativ-chronotropen Effekten einher [64]. Heraufregulation bzw. Reexpression von AT2-Rezeptoren erfolgt beim „Remodeling“ von Geweben, z.B. bei kardiovaskulären Erkrankungen wie Herzinsuffizienz, experimentell induzierter kardialer Hypertrophie, Myokardinfarkt, sowie bei Gefäßverletzung und Wundheilung [46] [63] [73] [76] [78] [103] [107]. Wharton et al. finden in Patienten mit terminaler Herzinsuffizienz und dilatativer Kardiomyopathie erhöhte AT2-Rezeptordichten in endokardialen und interstitiellen Regionen sowie den Rändern von infarzierten Regionen [111] und Tsutsumi et al. können eine solche verstärkte AT2-Expression den Fibroblasten zuordnen [104]. Ohkubo et al. weisen in Fibroblasten aus Herzen kardiomyopathischer Hamster eine Reexpression von AT2-Rezeptoren und eine durch AT2 vermittelte AT1-antagonistische Wirkung auf das Fortschreiten der Fibrose durch Hemmung des Collagenmetabolismus und des Fibroblastenwachstums nach [78]. In verschiedenen Arbeiten wird gezeigt, dass eine Stimulation von AT2-Rezeptoren in Endothelzellen [100], glatten Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten durch Hemmung von DNA-Synthese und Wachstum antiproliferativ wirkt und den Gehalt an extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronektin und Collagen I reduziert (Übersicht in [19]). Yamada et al. stellen eine AT2-vermittelte Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose) fest [113]. Die Signaltransduktionswege der AT2-Rezeptoren sind noch nicht vollständig geklärt. In glatten Gefäßmuskelzellen reduziert AT2-Überexpression die Proliferation und die MAPK-Aktivität [73]. MAPK-Inhibition führt nach Horiuchi et al. in PC12W-Zellen zu einer Inaktivierung von Bcl-2 und damit zur Induktion von Apoptose [37]. Diese MAPK-Hemmung kann vermittelt werden durch aktivierbare Phosphatasen, wie z.B. Gi-Protein-gekoppelte Protein-Tyrosin Phosphatasen (PTP) [113] und die Serin/Threonin Phosphatase 2A (PP2A) (Übersicht in [65]), bzw. durch die Tyrosin-Phosphatase SHP-1 [6]. Eine andere Möglichkeit der MAPK-Hemmung besteht in der ERK Phosphatase 1, MKP-1 (MAPK-Phosphatase-1), einer induzierbaren, phosphotyrosin- und phosphothreoninspezifischen Phosphatase [65]. Nach Matsubara et al. zählen zu den Wirkungen von AT2-Rezeptoren auch die Aktivierung von spannungsabhängigen Kaliumionenkanälen und die Hemmung von T-Typ Kalziumionenkanälen, wodurch sie Wachstumshemmung, die Einleitung von Apoptose und Vasodilatation vermitteln [65]. Die Mehrzahl der Untersucher geht von einer AT1-antagonistischen Wirkung von AT2-Rezeptoren in Bezug auf Zellwachstum und Vasokonstriktion aus [45].

1.2 Das kardiale Renin-Angiotensin-System

Das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) des Herzens beeinflusst zahlreiche Funktionen, wie myokardiale Kontraktilität, Inotropie, Metabolismus und koronare Vasokonstriktion. Die lokale Synthese von Ang II im Herzen spielt eine kritische Rolle im kardiovaskulären „Remodeling“ [105] [110]. Der Begriff „Remodeling“ beschreibt die Veränderungen in der kardialen Struktur, die bei linksventrikulärer Hypertrophie infolge von Hypertonie oder infolge eines Myokardinfarkts auftreten und ein exzessives Wachstum des „Nichtmyozyten-Kompartiments“ umfasst (Übersicht in [10]). Dies geschieht durch Hyperplasie von Fibroblasten, Hypertrophie von glatten Gefäßmuskelzellen in Koronararterien, myokardiale Fibrose durch verstärkte Ablagerung von extrazellulären Matrixproteinen, insbesondere Collagen und die Infiltration des Herzens durch Monozyten und Lymphozyten (Übersicht in [10]). Im Myozytenkompartiment kommt es zu langandauernden Änderungen der Genexpression, da die Kardiomyozyten die Zellmasse durch Proliferation nicht weiter steigern können. Hypertrophie bedeutet hier eine qualitative Änderung des Phänotyps durch Reexpression eines fetalen Genmusters mit Hochregulation der Markergene „ α -sketetal muscle actin“ und „ α -smooth muscle actin“ (Aktin von quergestreiften und glatten Muskelzellen), β -MHC („myosin heavy chain“), sowie das ANP („atrial natriuretic peptide“) (Übersicht in [85]). Die lokale Expression von Angiotensinogen, Renin, ACE und ATR wurde in kardialen Geweben nachgewiesen [69] [92]. Von besonderem Interesse ist die Verteilung der Angiotensinrezeptortypen in den Geweben und das Verhältnis der Rezeptorsubtypen zueinander, da hiervon entscheidend die Wirkung des Ang II auf das Gewebe abhängt.

1.2.1 Kardiale AT1-Rezeptoren

Die Verteilung der kardialen Angiotensinrezeptoren AT1 und AT2 ist abhängig von den untersuchten Herzkammern und Spezies. So überwiegen nach Nozawa et al. die AT1-Rezeptoren in den Herzen von Versuchstieren [77]. In bovinem, ventrikulären Myokard kommen AT1-Rezeptoren mit einem Anteil von 68% vor. In Rattenherzen kommen AT1-Rezeptoren im Erregungsbildungs- und leitungssystem sowie in niedrigen Konzentrationen in kardialen Myozyten vor [2]. In verschiedenen Untersuchungen [18] [90] [102] [106] wurden ATR vom AT1-Rezeptortyp in Zellkulturen von Fibroblasten aus Rattenherzen nachgewiesen. Ang II steigert durch AT1-Rezeptoren in Fibroblastenzellkulturen aus Rattenherzen die Synthese von

DNA und RNA, also die Proliferation und die Proteinexpression, insbesondere von extrazellulären Matrixproteinen wie Fibronectin, Collagen I und Collagen III [18] [34] [102] [106]. Die Aktivierung kardialer Rattenfibroblasten ist verantwortlich für die Ablagerung von fibrillärem Collagen I und Collagen III im Interstitium. Dies ist ein Merkmal der pathologischen Hypertrophie [11] [12]. Zu den profibrotischen Effekten von Ang II zählen die gesteigerte Fibroblastenproliferation, die Synthese und Sekretion von extrazellulären Matrixproteinen und profibrotischen Faktoren wie „transforming growth factor β “ (TGF- β) und „plasminogen activator inhibitor-1“ (PAI-1) [87]. Es kommt zu einer Versteifung der Ventrikel mit einer verschlechterten diastolischen und systolischen Funktion und letztendlich zu einer fortschreitenden Herzinsuffizienz. Im menschlichen Herzen sind AT1-Rezeptoren in relativ niedriger Konzentration in Koronargefäßen vorhanden [111] und im menschlichen Myokard kommen sie mit einem Anteil von 30–33% der Angiotensinrezeptoren vor [82] [84] [111]. Dabei sind AT1-Rezeptoren im Erregungsleitungssystem vorhanden. Somit besteht Übereinstimmung mit den bekannten positiv inotropen und positiv chronotropen Effekten von Ang II auf Kardiomyozytenkontraktion und Herzfrequenz. Weiterhin vermitteln AT1-Rezeptoren koronare Vasokonstriktion sowie langwirkende trophische Effekte. Diese stehen in Zusammenhang mit der Entwicklung von „Remodeling“ und Bluthochdruck [86] (Übersicht in [2]). Bei Herzinsuffizienz kommt es im humanen Myokard zu einer selektiven Herabregulation der AT1-Rezeptoren [3] (Überblick in [58]) [82]. So wurden in den Ventrikeln insuffizienter Herzen signifikant weniger AT1-Rezeptoren als in den Atrien derselben Herzen bzw. als in gesunden Ventrikeln gefunden [82]. Auch auf mRNA-Ebene konnte eine signifikante Verringerung der AT1-mRNA nachgewiesen werden [5].

1.2.2 Kardiale AT2-Rezeptoren

In Ratten wurden AT2-Rezeptoren im Myokard neonataler Tiere und, mit signifikant geringerer Dichte, im Myokard junger Tiere nachgewiesen. Dabei konnten von Wang et al. die AT2-Rezeptoren auf kardialen Myozyten, in der Regel jedoch nicht auf kultivierten kardialen Fibroblasten, festgestellt werden [18] [106] [109]. AT2-Rezeptoren sind in Tierexperimenten bei Gewebsumbauprozessen/„Remodeling“ vorhanden (Übersicht in [109]) und in einer Untersuchung von „Bio 14.6-kardiomyopathischen Hamstern“ mit Herzinsuffizienz wurde eine gegenüber Vergleichstieren erhöhte Expression von AT2-Rezeptoren nachgewiesen [78]. In den isolierten, AT2-exprimierenden Fibroblasten konnte die Collagensynthese, die DNA-Synthese und die Zellzahl durch eine selektive AT2-Antagonisierung gesteigert werden, so dass auf einen

AT1-antagonistischen Effekt der AT2-Rezeptoren geschlossen wurde, der im Verlauf der interstitiellen Fibrose die Collagensynthese und das Fibroblastenwachstum hemmte [78].

Im menschlichen gesunden Vorhofmyokard sind AT2-Rezeptoren mit einem Anteil von etwa 67–77% [82] [84] [111] die dominierenden Angiotensinrezeptortypen. In Ventrikeln von Patienten mit ischämischen Herzerkrankungen oder dilatativer Kardiomyopathie wurden hohe AT2-Anteile in endokardialen, interstitiellen, perivaskulären und infarzierten Regionen gefunden. Dabei stimmten die Regionen einer erhöhten AT2-Expression mit den Gebieten von Fibroblastenproliferation und Collagensynthese überein [111]. Auch Tsutsumi et al. konnten zeigen, dass in Proben aus insuffizienten menschlichen Herzen die AT2-Rezeptorexpression in Fibroblasten aus fibrösen Regionen heraufreguliert ist und dass die AT2-Rezeptoren die Fähigkeit haben, Ang II-vermittelte Wirkung auf Zellteilungen zu hemmen [104].

1.3 Physiologische und pathophysiologische Funktionen kardialer Fibroblasten

Zwei Drittel der myokardialen Zellen bestehen aus „Nichtmyozyten“, von denen Fibroblasten mit mehr als 90% den weitaus größten Anteil darstellen. Fibroblasten bilden Basalmembranbestandteile und extrazelluläre Matrixproteine wie Collagen I und Collagen III [9] [23]. Dabei ist Collagen Typ I der wichtigste von kardialen Fibroblasten produzierte Collagentyp, der über eine große Zugfestigkeit verfügt, mit einem hohen Anteil in Sehnen ausgebildet wird und im Herzen zu einer Verfestigung der Ventikel führt [61]. Collagenfibrillen vom Collagentyp III bilden feine Netzwerke aus und sind elastischer als die Collagenfibrillen vom Typ I. Eine differentielle Regulation zwischen beiden Collagentypen wird diskutiert. Beim „Remodeling“ kommt es zu einem exzessiven Wachstum des „Nichtmyozyten-Kompartiments“ mit einer Akkumulation von Collagen, vor allem Collagen Typ I, was die diastolische und systolische Herzfunktion verschlechtert [10]. Bisher sind Collagensynthese und Migration kardialer Fibroblasten gut untersucht in Nagetiermodellen [12] [15] [18] [31] [102] [106]. Die ATR-Verteilung und das Ausmaß der ATR-vermittelten Wirkung weisen dabei speziesspezifische Unterschiede auf [1] [28]. Nach Sen und Sil bewirkt Ang II in kardialen Fibroblasten direkt die Synthese eines spezifischen, parakrinen Faktors, der die Hypertrophie von Myozyten induziert. Diese Interaktion („cross talk“) zwischen Fibroblasten und Myozyten wird als ein wichtiger Faktor im Ang II-vermittelten Myozytenwachstum [97] angesehen.

Fibroblasten haben, wie viele andere Zellen, die Fähigkeit zur Chemotaxis. Das ist die gerichtete Migration der Zellen entlang eines Konzentrationsgradienten in Richtung eines chemoattraktiven

Stoffs. Die Migration wird vermittelt durch Integrine. Dies sind transmembranäre Rezeptoren, die einerseits an die extrazelluläre Matrix binden und andererseits direkt mit dem Zytoskelett, bestehend aus Aktin und Myosin, in Verbindung stehen [96]. Ang II-induzierte Migration wird durch AT1-Rezeptoren vermittelt und von Xi et al. konnte gezeigt werden, dass in VSMC dieser Effekt durch die Aktivierung von MAPK transduziert wird [107] [112]. Als Untersuchungsmethode für die Chemotaxis von Zellen wird oft die Bewegung der Zellen von einer Seite einer porösen Membran zur anderen Seite benutzt (Übersicht in [29]). Gut untersucht ist bisher die Migration von glatten Gefäßmuskelzellen bei Gefäßläsionen. Sie spielt eine wichtige Rolle bei der Neointimabildung [20] [32] [39]. Weniger Informationen sind zur Migration von Fibroblasten vorhanden. Im Myokard ist die Interaktion von Fibroblasten mit der umgebenden Matrix entscheidend für Reparaturvorgänge mit Matrixproduktion und Zellmotilität [31]. Fibroblasten bilden außer Proteinen zur Collagenfasersynthese auch andere extrazelluläre Matrixproteine wie z.B. Fibronectin, Collagenase und Stromelysin, die für die Zelladhäsion und -migration wichtig sind (Übersicht in [7]). Collagenase und Stromelysin lösen dabei die extrazelluläre Matrix auf und verstärken Migration und Remodeling. Die chemotaktische Wirkung von PDGF auf Fibroblasten ist seit langem bekannt [33] [95] [96]. Kürzlich konnte ein konzentrationsabhängiger, chemotaktischer Effekt von Ang II auch auf Fibroblasten nachgewiesen werden, der durch AT1-spezifische Antagonisten aufgehoben wurde [31].

1.4 Fragestellung

Antagonistische Effekte zwischen AT1- und AT2-Rezeptortypen sind bereits beschrieben in Bezug auf Zellproliferation [66] [73], Aktivierung der MAPK [73], Collagenstoffwechsel [78] und interstitielle Fibrose in kardialem „Remodeling“ sowie in Bezug auf Vasotonus und Zellwachstum [45]. AT2-Effekte auf die Funktion kardialer Fibroblasten in vitro sind noch wenig untersucht, was vor allem daran liegt, dass dieser Zelltyp in der Zellkultur keine AT2-Rezeptoren mehr exprimiert.

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit war daher, ob der AT2-Rezeptor in kultivierten kardialen Fibroblasten einen AT1-antagonistischen Effekt, bezogen auf die Collagen-mRNA-Expression und die Migration, ausübte. Beim kardialen „Remodeling“ wurden AT2-Rezeptoren vermehrt auf Fibroblasten exprimiert [78] [104] [111]. In Zellkulturen primärer kardialer Fibroblasten dagegen wurde dieser Rezeptorsubtyp durch den Einfluss von Wachstumsfaktoren schnell herabreguliert und war nicht mehr nachweisbar [81]. In der vorliegenden Arbeit wurden

AT2-Rezeptoren daher mit Hilfe von adenoviralen Expressionsvektoren in den Fibroblasten überexprimiert. Da humane kardiale Fibroblasten nicht in ausreichender Menge zur Verfügung standen und Schweinezellen auf Nukleinsäure- und Proteinsequenzebene die höchste Homologie zu humanen Zellen besaßen, wurden porcine kardiale Fibroblasten in der vorliegenden Arbeit verwendet.

2 Methoden

Abbildung 1 zeigt einen schematischen Überblick über den Ablauf der Experimente.

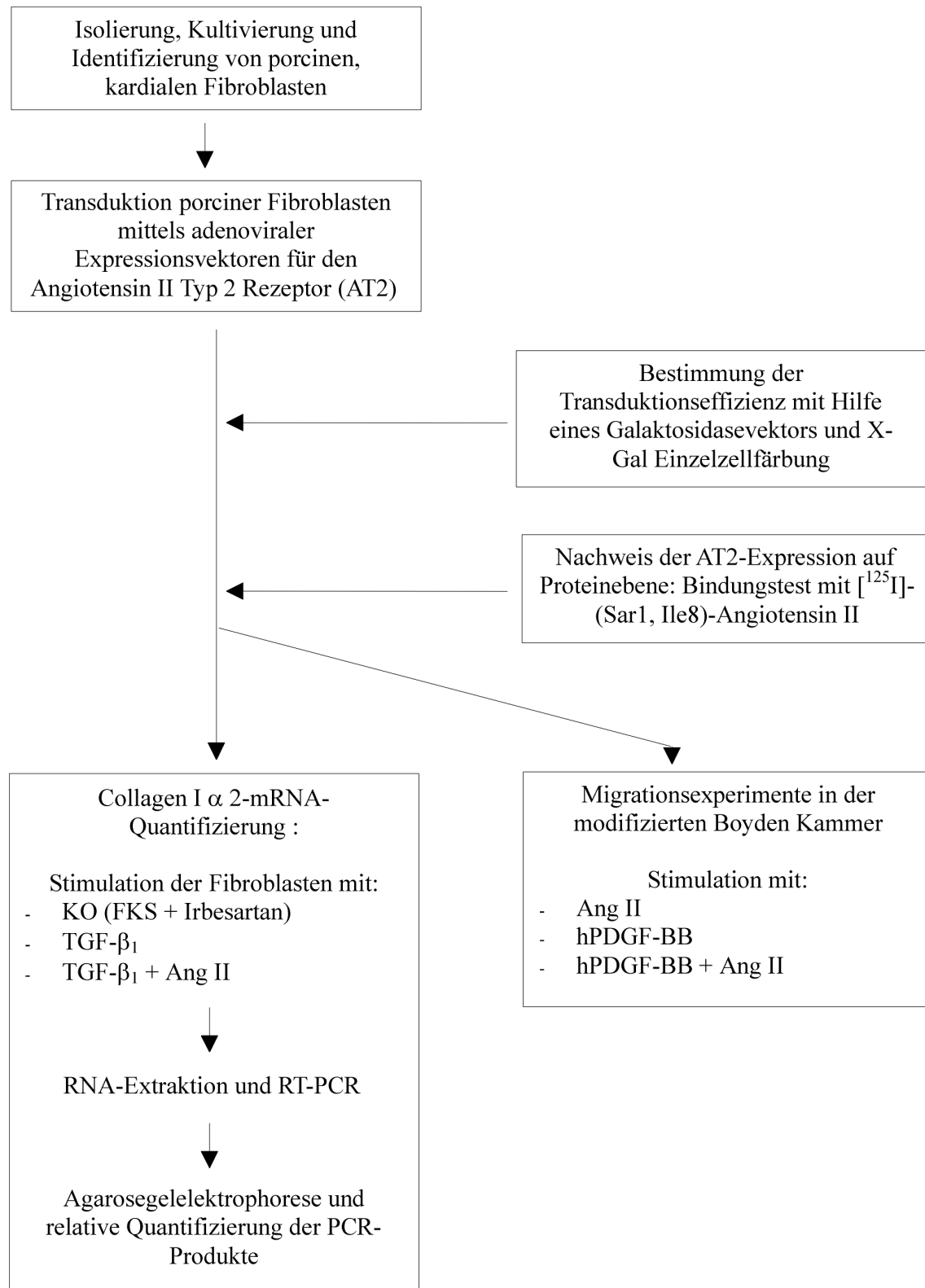


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Ablaufs der Experimente

Ang II:	Angiotensin II (1 μ M)
FKS:	Fetales Kälberserum (0,4%)
hPDGF-BB:	„Human platelet derived growth factor BB-Homodimer“ (20ng/ml)
Irb:	Irbesartan (10 μ M)
KO:	Kontrollansatz
RT-PCR:	Reverse Transkription Polymerasekettenreaktion
TGF- β_1 :	„Transforming growth factor β_1 “ (10 ng/ml)
X-Gal:	5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-galactosid

2.1 Zellkultur

2.1.1 Isolierung porciner Fibroblasten

Porcine Fibroblasten wurden aus Ventrikeln gesunder Schweine (Deutsche Landrasse, 3 bis 5 Monate alt) isoliert, die im Rahmen von OP-Übungen des Deutschen Herzzentrums Berlin im Forschungshaus operiert wurden und nach den Operationen nach Tierschutzgesetz §§ 8 und 9 euthanasiert wurden. Die Isolierung von kardialen Fibroblasten wurde nach der von Neuß et al. beschriebenen Methode durchgeführt [74]. Eingesetzt wurde ein Gemisch aus Collagenase, Trypsin und Dispase in Krebs-Henseleit Puffer (KHB). Zur pH-Wert-Einstellung des Krebs-Henseleit-Puffers wurde zu einer Dose KHB 2,1 g Natriumhydrogencarbonat (NaHCO_3) zugegeben und mit Salzsäure (HCl) auf einen pH-Wert von 7,4 eingestellt. Zu 50 ml des Krebs-Henseleit-Puffers wurden 750 μ l Kalziumchlorid (CaCl_2 0,1 M) gegeben. Die Enzymlösung wurde aus 1,805 ml Bovines-Serum-Albumin (BSA 7,5%), 0,5 ml Hepes-Pufferlösung (1 M), 1,85 ml Collagenase (2%), 240 μ l Trypsin (2,5%) und 192 μ l Dispase Stocklösung (24 U/ml) hergestellt und mit der vorher erstellten KHB-Kalziumchlorid-Lösung auf eine Gesamtmenge von 50 ml KHB-Enzym-Gemisch aufgefüllt. Das Gemisch aus Krebs-Henseleit-Puffer und Enzymen (KHB-Enzymlösung) wurde vor jeder Zellisolierung frisch angesetzt. Vor der Fibroblastenisolierung wurde das porcine Herz mit einer kalzium- und magnesiumfreien Phosphat-Pufferlösung (PBS) gespült. Zur Isolierung von Fibroblasten aus den Herzstücken wurden grundsätzlich zwei Inkubationen durchgeführt, da in der ersten Inkubation außer Fibroblasten auch viele Nichtfibroblasten (Endothelzellen, Erythrozyten, Leukozyten, Perizyten und glatte Gefäßmuskelzellen) aus den Herzproben gelöst wurden. In dem aus der zweiten Inkubation gewonnenen Überstand waren hauptsächlich Fibroblasten mit einem geringeren Anteil anderer Zellen vorhanden. Etwa 0,5 cm^3 -große Stücke des porcinen Myokards wurden mit einer chirurgischen Schere in 1 bis 2 mm große Stückchen zerteilt, zu 5 ml KHB-Enzymgemisch gegeben und für 20 min im Wasserbad bei einer Temperatur von 37 °C inkubiert. Der nach dieser Inkubation entstandene Überstand (erster Überstand) wurde mit den darin enthaltenen

Zellen abgenommen und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 20 ml PBS-Lösung überführt. Zu dem verbliebenen Sediment wurden 5 ml frischer KHB-Enzymlösung zugegeben und erneut für 20 min im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Der nach dieser zweiten Inkubation gebildete Überstand (zweiter Überstand) und die darin enthaltenen Zellen wurde wiederum in ein 50 ml Falcon-Röhrchen mit 20 ml PBS-Lösung überführt.

Die nach den Inkubationen abgenommenen Überstände mit den darin suspendierten Zellen wurden in einer Heraeus Instruments Megafuge 1.0 R-Zentrifuge bei 173 x g (1000 U/min) für 10 min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden resuspendiert, mit PBS-Lösung gewaschen und in Zellkulturmedium, bestehend aus „Dulbecco's Modifiziertem Eagle Medium“ (DMEM) mit einem Anteil von 10% fetalem Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10 mM Hepes-Pufferlösung in Kulturschalen von 10 cm Durchmesser, ausgebracht. Die Kulturschalen mit der Zellsuspension wurden für 1 h bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit adhärten vorwiegend Fibroblasten. Die nichtadhärenten Zellen, vorwiegend Nichtfibroblasten, wurden durch Spülung mit eiskaltem PBS entfernt. Anschließend wurde frisches Zellkulturmedium zugegeben. In den folgenden Tagen erfolgte täglich ein Mediumwechsel. Dabei wurden Zelldetritus (z.B. Bruchstücke von Myozyten) und eventuell vorhandene Bakterienkontaminationen durch Spülung mit PBS entfernt. Frisches Zellkulturmedium wurde zugegeben und nach zwei bis fünf Tagen waren spindel- bzw. sternförmige Fibroblasten sichtbar.

2.1.2 Kultivierung porciner Fibroblasten

Die isolierten porcinen kardialen Fibroblasten wurden in einem Brutschrank mit 5% CO₂, 37 °C und 100% Luftfeuchtigkeit mit dem oben beschriebenen Zellkulturmedium kultiviert. An jedem zweiten bis dritten Tag wurden die Zellkulturschalen auf Kontaminationen und Zellwachstum kontrolliert. Dabei wurde das Wachstum der Fibroblasten kontrolliert und das Medium gewechselt. Die Zellkulturen wurden einmal wöchentlich im Verhältnis 1:3 passagiert. Es wurde darauf geachtet, dass die Zellen vor Erreichen der Konfluenz umgesetzt wurden, um nicht solche Zellen zu selektieren, die die Kontaktinhibition verloren hatten. Zum Umsetzen wurden die Zellen mittels einer Trypsin-EDTA-Lösung von den Kulturschalen gelöst, im Verhältnis 1:3 aufgeteilt und in frischem Medium erneut in Kulturschalen ausgebracht. Für die Experimente wurden Zellen der vierten bis sechsten Passage verwendet.

2.1.3 Identifizierung von Fibroblasten in der Zellkultur

Zum Erkennen der Zelltypen in den Zellkulturen wurde die Morphologie der Zellen im mikroskopischen Bild analysiert. Untersucht wurde die Form der Zellen sowie der Aufbau der Zellschicht in der Zellkultur. Bei der Untersuchung der Zellschicht wurde insbesondere darauf geachtet, ob die Zellen eine stern- bzw. spindelförmige Gestalt hatten oder ob sie ein „kopfsteinpflasterartiges“ Wachstumsmuster, das typisch für Endothelzellen ist, aufwiesen [12]. Ein spezifischerer Nachweis von Fibroblasten ist die immunhistologische Markierung der Zellen mit fibroblastenspezifischen Antikörpern. In der vorliegenden Arbeit wurde die Antikörperbindung mit der Avidin-Biotin (LAB-SA) Methode, die nach Elias et al., verglichen mit anderen Methoden, über eine hohe Sensitivität verfügt, nachgewiesen [25]. Zur Identifizierung der Fibroblasten wurde die Anfärbbarkeit mit monoklonalen Anti-Vimentin-Antikörpern und Anti-von-Willebrand-Faktor-Antikörpern in Kombination mit dem kommerziell erhältlichen Testkit „Zymed^R-LAB-SA System“ überprüft. Von den wie in Kapitel 2.1.2 beschrieben kultivierten Zellen wurden 100.000 Zellen in einer Suspension von 1 ml in Objektträgerkammern („chamber slides“) ausgebracht und im Brutschrank kultiviert. Vor Erreichen der Konfluenz wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 4% Paraformaldehyd in PBS für 10 min fixiert. Um unspezifische Antikörperbindung zu verhindern, wurden pro Kammer 100 µl der „Serum Blocking“-Lösung zugegeben und für 10 min inkubiert. Zur Inkubation mit primären Antikörpern wurden je 300 µl Anti-Vimentin-Antikörper in einer Konzentrationen von 0,125 µg/ml zugegeben und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden ungebundene Antikörper in PBS abgespült. Je 100 µl der biotinylierten zweiten Antikörper wurden pro Kammer zugegeben, für 10 min inkubiert und anschließend gespült. Um die Enzymreaktion zu ermöglichen, wurde für 10 min 100 µl Enzymkonjugat pro Kammer zugegeben. Die Anfärbung mit einem "Aminoethyl Carbazole Substrate Kit" machte die Avidin-Biotin-Reaktion sichtbar. Dazu wurden die Zellen für 3 bis 5 min mit der Chromogen-Substrat-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 s bei Raumtemperatur mit „Mayers Hämalaunlösung“ gegengefärbt.

2.2 Überexpression des humanen AT2-Rezeptors

Auf Grund ihrer, im Vergleich zu Zelllinien relativ geringen Proliferationsrate, lassen sich primäre Zellen nur schwer mit physikalischen (z.B. Elektroporation) oder chemischen Transfektionsmethoden (z.B. DEAE-Dextran, Lipofektion) mit Expressionsplasmiden

transfizieren. Aus diesem Grund werden zur Transfektion primärer Zellen häufig virale Vektoren, insbesondere replikationsdefiziente adenovirale Vektoren, verwendet. Adenovirale Vektoren haben ein sehr breites Wirtszellspektrum. Sie heften sich über den „Coxsackie Adenovirus Receptor“ (CAR) an die Wirtszellen an, werden über $\alpha_v\beta_3$ - und β_5 -Integrine, die von den meisten Zellen exprimiert werden, in die Zellen aufgenommen, sind leicht in hohen Titern herzustellen und führen zu einer effizienten Transduktion der Zellen. Nachteile der adenoviralen Vektoren sind: 1.) Da das Vektorgenom nicht in das Wirtsgenom integriert wird, also episomal verbleibt, geht es bei nachfolgenden Zellteilungen sukzessive verloren. 2.) Die Zellen exprimieren auch einige adenovirale Proteine. Dies stellt hauptsächlich ein Problem bei der Gentherapie dar, da es zur Immunantwort gegen die adenoviralen Proteine kommt und infizierte Zellen so eliminiert werden.

Zur Untersuchung der durch Angiotensin II Typ 2 Rezeptoren vermittelten Wirkung von Angiotensin II wurden porcine Fibroblasten mit Hilfe des Ad5AT2-Expressionsvektors transduziert. Sie überexprimierten daraufhin den AT2-Rezeptor auf der Zellmembran. Um einen spezifischen AT2-vermittelten Effekt von einer allgemeinen, durch die Virusinfektion ausgelösten Wirkung abgrenzen zu können, wurde zur Kontrolle das Antisense-Konstrukt Ad5TA2 eingesetzt. Bei den nachfolgenden Experimenten wurden Ad5AT2-, Antisense-(Ad5TA2)- und nichttransduzierte Fibroblasten stimuliert.

2.2.1 Herstellung und Charakterisierung der verwendeten adenoviralen Vektorkonstrukte Ad5AT2 und Ad5TA2

Die Überexpression des humanen Angiotensin II Typ 2 Rezeptors erfolgte mit Hilfe eines replikationsdefizienten, adenoviralen Expressionsvektors. Der adenovirale Expressionsvektor Ad5AT2 und das entsprechende Antisense-Konstrukt, Ad5TA2, wurden in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. W. Ch. Poller und Frau Dr. U. Marienfeld im Institut für Klinische Biochemie und Pathobiochemie der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg hergestellt. Als Grundlage diente der adenovirale Vektor Ad5RR, bei dem die E1a Region des Virusgenoms durch die Expressionskassette für den AT2-Rezeptor aus dem Plasmid pZS2 ersetzt wurde (siehe Abbildung 2). Das Ad5TA2 enthielt den AT2-ORF („open reading frame“) in der entgegengesetzten Orientierung. Der adenovirale Vektor war auf Grund der E1a-Deletion replikationsdefizient. Die adenoviralen Vektoren wurden auf 293 HEK („Human Embryonal Kidney“)-Zellen vermehrt. In diesen Zellen waren 10% des 5'-Bereichs des adenoviralen

Genoms ins zelluläre Genom integriert, so dass sie E1-Proteine exprimierten und den Gendefekt des viralen Vektors ausglich. In 293 HEK-Zellen fand daher eine vollständige Virusreplikation statt. Die Infektion verlief lytisch. Die aufgereinigten Vektorstocks wurden auf 293 HEK-Zellen in einem Plaque-Assay titriert und die Anzahl der pfu („plaque forming units“)/ml wurde bestimmt. Die S2-Arbeiten wurden freundlicherweise von Frau Dr. Ch. Warnecke durchgeführt.

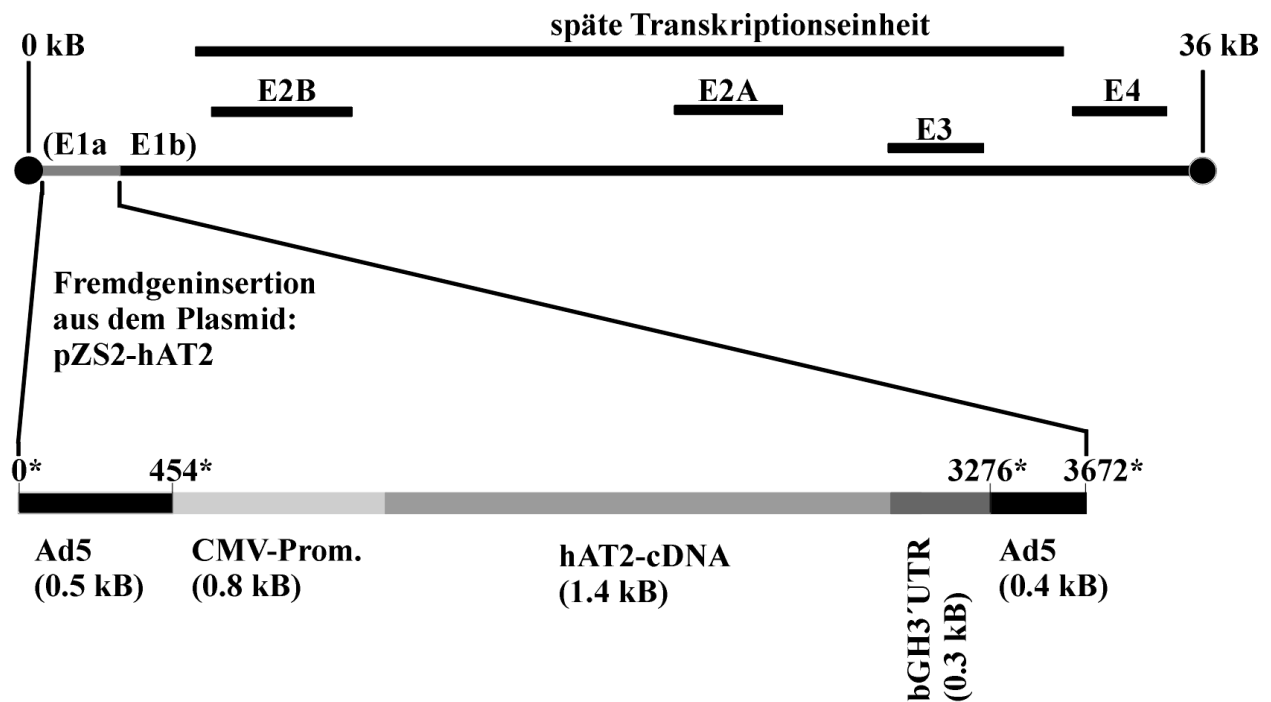


Abbildung 2: Genomstruktur des adenoviralen Expressionsvektors für den humanen Angiotensin II Rezeptorsubtyp 2 (AT2)

Ad5:	Adenovirus Serotyp 5
Ad5RR:	Vektorgrundgerüst mit E1-Deletion
bGH3'UTR:	3'untranslatierte Region des bovinen Wachstumshormons
CMV-Promotor:	Zytomegalievirus-Promotor
E1A-E4:	Frühe Transkriptionseinheiten
h AT2-cDNA:	cDNA mit proteinkodierender Region des humanen AT2-Rezeptors
kB:	Kilobasenpaare
pZS2-hAT2:	Plasmidexpressionsvektor für den menschlichen AT 2-Rezeptor
*:	Nukleotidposition im Ad5RR-Genom

2.2.2 Durchführung der Transduktion porciner Fibroblasten mittels adenoviraler Vektoren

Zur Vorbereitung der Transduktion wurden die Zellen am Abend vor der Infektion in frischen Kulturschalen ausgesetzt. Die Infektion wurde durchgeführt in DMEM mit einem Anteil von 2% FKS, 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10 mM Hepes. Bei einer Schale von 15 cm Durchmesser wurden 7,5 ml Medium bzw. 2,5 ml Medium bei einem Schalendurchmesser von 10 cm eingesetzt. Es erfolgte eine Infektion mit einer m.o.i. („multiplicity of infection“, Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle) von 100 bis 500 für eine Dauer von einer Stunde bei 37 °C. Dabei wurden die Schalen alle 10 min geschwenkt, um ein Austrocknen der Zellen zu verhindern. Anschließend wurde das Medium gewechselt. Der zweite Mediumwechsel erfolgte am darauffolgenden Tag. Dabei wurde Hungermedium (DMEM 0,4% FKS, 100 U/ml Pen, 100 µg/ml Strep, 2 mM L-Glut und 10 mM Hepes-Pufferlösung) eingesetzt. Da das adenovirale Genom zum überwiegenden Teil nicht ins Genom der Wirtszelle integriert wurde, d.h. episomal vorlag, nahm die Zahl der Vektorgenome pro Zelle mit jeder Zellteilung ab. Die Experimente wurden deshalb innerhalb einer Woche nach der Infektion durchgeführt.

2.2.3 Bestimmung der Transduktionseffizienz mit Hilfe eines adenoviralen β -Galaktosidase-Expressionsvektors (Ad5LacZ) und X-Gal Einzelzellfärbung

Zur Feststellung der Transduktionseffizienz wurde in der vorliegenden Arbeit ein adenoviraler β -Galaktosidase-Expressionsvektor (Ad5LacZ) mit anschließender X-Gal-Einzelzellfärbung eingesetzt. Kardiale Fibroblasten wurden, wie in Kapitel 2.2.2 beschrieben, mit dem adenoviralen β -Galaktosidase-Expressionsvektor (Ad5LacZ) infiziert. Der adenovirale β -Galaktosidasevektor wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Th. Eschenhagen zur Verfügung gestellt. Nach der adenoviralen Transduktion wurden die Zellkulturschalen mit PBS gespült, für 5 min bei Raumtemperatur mit 0,2% Glutaraldehyd und 1% Formaldehyd in PBS fixiert und zweimal mit PBS gewaschen. Die X-Gal-Färbung beruhte auf dem Umsatz von 5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal) durch die β -Galaktosidase in einen schwerlöslichen, blauen Indigofarbstoff. Dies geschah nur in den Ad5LacZ-transduzierten Zellen; nichttransduzierte Fibroblasten blieben ungefärbt. Die β -Gal-Färbelösung wurde frisch angesetzt aus PBS inkl. 4 mM Ferricyanid (gelbes Blutlaugensalz), 4 mM Ferrocyanid (rotes Blutlaugensalz), 2 mM Magnesiumchlorid und 5-Chlor-4-Brom-3-indolyl- β -D-galactosid (X-Gal, 30 µl der 20 mg/ml Stocklösung gelöst in 15 ml PBS; final: 0,04 mg/ml). Zur Färbung wurden 750 µl der

Färbelösung pro Zellkulturschale von 30 mm Durchmesser gegeben und für mindestens 6 h bei 37 °C inkubiert. Ausgewertet wurden die Färbungen bei 40-facher Vergrößerung in Dunkelfeldmikroskopie. Der prozentuale Anteil transduzierter und damit blaugefärbter Zellen wurde bestimmt.

2.2.4 Nachweis der Expression des Angiotensin II-Rezeptoren durch Messung der [¹²⁵I]-(Sar1, Ile8)-Ang II-Bindung

Die Expression des AT2-Rezeptors wurde in einem Bindungsassay unter Verwendung von [¹²⁵I]-(Sar1, Ile8)-Ang II, kaltem, d.h. nicht radioaktiv markiertem Ang II und subtypspezifischen Liganden nachgewiesen. Als AT1-Rezeptor-Antagonist wurde Irbesartan benutzt. PD 123319 und CGP 42112 dienten als AT2-Rezeptor-Antagonisten. Zur Vorbereitung der Zellkulturen wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Kulturschalen Zellen wurden mit PBS gespült. Die Zellen wurden mit 250 µl Glycinpuffer (50 mM Glycin, pH 3,0 und 150 mM Natriumchlorid) pro 30 mm-Zellkulturschale bei 4 °C für 30 min inkubiert, um gebundenes Ang II zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit 500 µl Bindungspuffer (0,25% Bovines Serum Albumin (BSA), 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂) gewaschen. Die Blockierung von Ang II-Bindungsstellen wurde mit Ang II in Konzentrationen von 1 µM bis 10 nM, mit Irbesartan und PD 123319 oder CGP 42112 in Konzentrationen von 10 µM bis 0,1 µM für 30 min bei Raumtemperatur durchgeführt. Ang II und die Antagonisten waren dabei gelöst in 140 µl Bindungspuffer. Zur Inkubation mit dem ¹²⁵I-markierten nicht-subtyp-spezifischen Liganden (Sar1, Ile8)-Ang II (2130 Ci/mmol) wurden 20 µl Tracer-Arbeitslösung pro well zu einer finalen Konzentration von 0,25 nM bzw. 0,1 µCi/well zugegeben. Die Inkubation wurde für 1 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Dabei wurde die Zellkulturschalen mehrfach leicht geschwenkt. Nach der Inkubation wurden die Zellen viermal mit 500 µl PBS gespült und dann in 500 µl NaOH (2 M) lysiert. Die Vertiefungen/Kavitäten wurden anschließend mit 500 µl einer 1%-igen Natriumdodecylsulfat-Lösung (SDS-Lösung) gespült. Das Lysat und die jeweilige SDS-Spüllösung wurden zusammen in ein Meßröhrchen gegeben und die ¹²⁵I-Aktivität wurde im „Wallac Wizard Counter“ gemessen.

Der Kontrollansatz (KO) enthielt nur Bindungspuffer ohne kaltes Ang II oder Rezeptorantagonisten. Hier band während der Inkubation [¹²⁵I]-(Sar1, Ile8)-Ang II spezifisch an die Angiotensin II-Rezeptoren sowie zu einem geringen Prozentsatz unspezifisch an die Zelloberfläche. Die ¹²⁵I-Aktivität in diesem Ansatz entsprach der Gesamt-Angiotensin II

Bindung, von der die [^{125}I]- (Sar1, Ile8)-Ang II-Bindung in Gegenwart von 1 μM Ang II abgezogen wurde, um die spezifische [^{125}I]- (Sar1, Ile8)-Ang II-Rezeptorbindung zu erhalten. In den Ansätzen mit subtypspezifischen Rezeptorblockern wurden die Angiotensinrezeptoren subtypabhängig gebunden. Dabei band [^{125}I]- (Sar1, Ile8)-Ang II nach Vorinkubation mit Irbesartan an die AT₂-Rezeptoren bzw. nach Vorinkubation mit den AT₂-spezifischen Liganden PD123319 oder CGP42112 an die AT₁-Rezeptoren. Die Arbeiten zum Nachweis der AT₂-Rezeptorexpression wurden freundlicherweise von Frau Dr. Ch. Warnecke durchgeführt.

2.3 RT-PCR-Nachweis und relative Quantifizierung von spezifischen RNA-Transkripten in heterogenen Pools von RNAs

Die Reverse Transkription (RT) nach Kawasaki et al. ist eine Methode zur Umschreibung kleinster Mengen zytoplasmatischer RNA in cDNA (copy-DNA) und zur spezifischen Anreicherung einzelner Gensequenzen daraus [52]. Im Vergleich zu anderen RNA-Nachweisverfahren, z.B. der Northern-Blot-Analyse, ist die Sensitivität der RT-PCR erheblich größer [68]. Um die Polymerasekettenreaktion (PCR) [70] zur Vervielfältigung einzelner Nucleotidsequenzen nutzen zu können, erfolgt zuerst eine enzymatische Umschreibung der zytoplasmatischen RNA in eine DNA-Kopie mittels einer gentechnisch modifizierten, retroviralen, RNA-abhängigen DNA-Polymerase, der Reversen Transkriptase [56]. Aus der so gewonnenen cDNA werden mittels spezifischer Oligonucleotidprimer definierte cDNA-Bereiche vervielfacht.

In der vorliegenden Arbeit wurden Bereiche aus dem Collagen I α 2-Gen und aus dem β -Actin-Gen vervielfältigt. Die Produkte der PCR wurden im Agarosegel analysiert und anhand der Bandenintensität quantifiziert. Die Collagen I α 2-mRNA-Expression wurde in Relation gesetzt zur β -Actin-mRNA-Expression (siehe Abbildung 3).

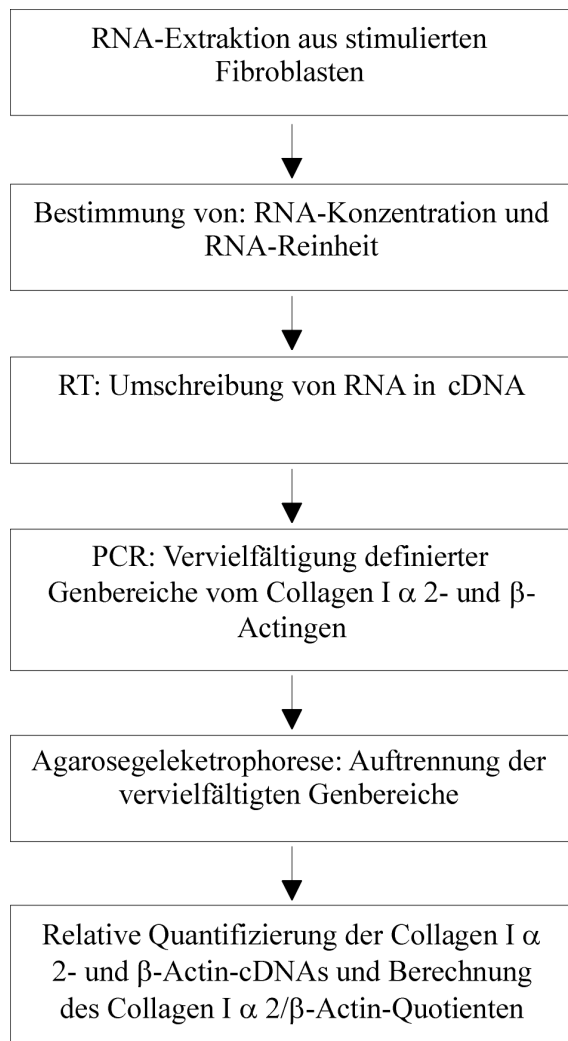


Abbildung 3:Schematische Darstellung der RT-PCR von Collagen I α 2- und β -Actin-mRNA

cDNA: „Complementary“ bzw. „copy“-Desoxyribonucleinsäure

PCR: Polymerasekettenreaktion

RNA: Ribonucleinsäure

RT: Reverse Transkription

2.3.1 RNA-Extraktion

Zur Isolierung der zytoplasmatischen RNA aus den Zellen wurde eine Modifikation der von Chomczynski und Sacchi [16] beschriebenen Methode benutzt. Um die Degradation der RNA durch ubiquitär vorhandene RNA-degradierende Enzyme (RNasen) zu verhindern, wurden nur RNase-freie Chemikalien und Diethylpyrocarbonat-(DEPC)-behandeltes Wasser, Plastikeinmalware oder bei 180 °C für 8 h gebackenes Glas eingesetzt. Alle Reaktionen wurden in eisgekühlten Reaktionsgefäßen durchgeführt und die Zentrifugen wurden vor und während der Benutzung auf eine Temperatur von 4 °C gekühlt.

Zum Ablösen der Fibroblasten von der Zellkulturschale wurde 2 ml Trypsin-EDTA (1x) pro Zellkulturschale von 10 cm Durchmesser gegeben und für 5 bis 10 min bei 37 °C inkubiert. Das Trypsin-EDTA (1x) wurde mit 10 ml DMEM mit einem Anteil von 10% FKS inaktiviert und die Zellen wurden für 10 min bei 173 x g (1000 U/min) in einer „Megafuge 1.0 R“-Zentrifuge pelletiert. Das Resuspendieren des Zellpellets in eiskaltem PBS entfernte Zellkulturmedium und Trypsinreste von den Zellen. Die Zellen wurden in ein 2 ml-Eppendorfgefäß überführt und für 10 min bei 1000 x g pelletiert. Diese Zentrifugation erfolgte, wie auch die anschließenden Zentrifugationen, in einer „Eppendorf“-Zentrifuge. Das so gewonnene Zellpellet wurde in 200 µl NP40-Lysispuffer, bestehend aus: 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂ und 0,5% (v/v) NP40, aufgenommen und für 5 min auf Eis lysiert. Die Zellkerne wurden für 5 min bei 1500 x g pelletiert. Der zytoplasmatische Überstand wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Zellkerne mit dem Überstand entnommen wurden. Zum Überstand wurden 400 µl Lösung D, bestehend aus: 6 M Guanidiniumisothiocyanat (GuSCN), 37,5 mM Natriumcitrat, pH 7,0, 0,75% N-Lauryl-Sarcosin sowie 0,15 M β-Mercaptoethanol, 0,5% Sarcosyl und 0,1 M β-Mercaptoethanol sowie 60 µl 2 M Natriumacetat pH 4,0 gegeben und gut gemischt. 600 µl saures, d.h. wassergesättigtes, Phenol und 125 µl Chloroform (CHCl₃)/Isoamylalkohol (25:1) wurden zugegeben und die RNA wurde in der darauffolgenden, 20-minütigen Inkubation auf Eis extrahiert. Durch Zentrifugation für 20 min bei 12.000 x g wurden die wässrige und die organische Phase getrennt. Die wässrige, obere Phase mit der darin enthaltenen RNA wurde abgenommen und in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Es wurde 1 VT Chloroform (CHCl₃)/Isoamylalkohol (25:1) hinzugefügt, gut gemischt, für 10 min auf Eis inkubiert und anschließend für 15 min bei 12.000 x g zentrifugiert. Der wässrige Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die RNA wurde mit 1 VT

Isopropanol und 1 µl Glykogen über Nacht bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ ausgefällt. Anschließend wurde die RNA für 30 min bei $18.000 \times g$ abzentrifugiert. Das so entstandene RNA-Pellet wurde mit 500 µl Ethanol (70%) gewaschen, für 30 min bei $18.000 \times g$ zentrifugiert und anschließend in 23 µl H_2O aufgenommen. Die Langzeitlagerung erfolgte in gefälltem Zustand in 70%-igem Ethanol bei einer Temperatur von $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

2.3.2 Bestimmung von Reinheit und Konzentration der extrahierten RNA

Zur Bestimmung der RNA-Reinheit wurde die optische Dichte in Verdünnungen von 1:100 bzw. 1:50 bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD_{260}) und 280 nm (OD_{280}) gemessen und es wurde der Quotient aus OD_{260} und OD_{280} bestimmt. In H_2O gelöste RNA wies einen $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Quotienten von 1,6 bis 1,75 auf. Niedrigere $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Quotienten wiesen auf eine Kontamination der Probe durch Proteine hin. Nukleinsäuredegradationen verursachten größere als die o.g. $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ -Quotienten. Aus der OD_{260} wurde der RNA-Gehalt berechnet. Ein OD_{260} entsprach einem RNA-Gehalt von 40 µg RNA/ml.

RNA-Proben mit Quotienten in dem o.g. Bereich von 1,6 bis 1,75 wurden akzeptiert. Die Messung der optischen Dichte der RNA-Lösung wurde mit einem "Ultrospect 2000"-Photometer vorgenommen.

2.3.3 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription (RT) ist die durch die Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, katalysierte Umschreibung von RNA in eine DNA-Kopie (cDNA). Die Reverse Transkriptase benötigt doppelsträngige Sequenzen als Ausgangspunkte für die Synthese des cDNA-Strangs. Oligonukleotid-Hexamere zufälliger Sequenz („Random Hexamer Primer“) werden zur RNA gegeben. Sie lagern sich den RNA-Strängen komplementär an und bilden die Startpunkte für die Reverse Transkriptase. So wird die gesamte RNA in cDNA umgeschrieben.

Die RT wurde durchgeführt in Ansätzen von 25 µl oder 50 µl. Die RNA wurde so verdünnt, dass sie in einer Konzentration von 250 µg/ml vorlag. 2 µl dieser Verdünnung, also 0,5 µg RNA, wurden in einen Ansatz aus: 5 µl First Strand Buffer (5 x), 2 µl Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTP), final: je 200 µM, 2,5 µl Random Hexamer Primer, final: 5 µM, 2,5 µl Dithiotreitol (DTT), final: 10 mM, 1,25 µl (50 U) RNasin (Recombinant Ribonuclease Inhibitor), 8,75 µl H_2O und 1 µl (200 units) Superscript II Reverse Transkriptase transkribiert. Zum Ausschluss

einer DNA- bzw. PCR-Produkt-Kontamination der verwendeten Reagentien und Materialien wurde eine H₂O-Kontrolle durchgeführt. Dazu wurden in einem Ansatz 2 µl H₂O anstatt der RNA zu den übrigen Reagentien gegeben und ansonsten wie die übrigen Ansätze behandelt. Eine Inkubation von 5 min bei 65 °C löste RNA-Sekundärstrukturen auf. In der sofort anschließenden Inkubation für 1 min auf Eis kühlte die Lösung schnell ab, die Random Hexamers lagerten sich der RNA an und Sekundärstrukturen konnten sich nicht Neubilden. Zur Kontrolle der RNA auf mögliche DNA-Kontaminationen wurde eine "RT-Minus-Kontrolle" durchgeführt. Dazu wurden 5,0 µl des RT-Ansatzes vor Zugabe der Reversen Transkriptase abgenommen, in eine neue Reaktionsröhre überführt und ohne Umschreibung durch die Reverse Transkriptase in der später folgenden PCR eingesetzt. Zu dem verbleibenden Reaktionsansatz wurde ein Gemisch aus 200 U SuperscriptTM II RNase H⁻ Reverse Transkriptase und 10 U RNasin bei 25 µl-Ansatz bzw. 300 U Superscript RT IITM und 20 U RNasin bei einem 50 µl-Ansatz gegeben. Die Umschreibung von RNA in cDNA wurde für 45 min bei 37 °C bzw. 42 °C durchgeführt. Beendet wurde die Reaktion durch eine zehnminütige Inaktivierung des Enzyms bei 93 °C.

2.3.4 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR) wurden definierte Bereiche des Collagen I α 2- und des β -Actingens der cDNA vervielfältigt. Durchgeführt wurde die PCR in Ansätzen von 25 µl oder 50 µl. Für einen 25 µl Ansatz wurden 2,5 µl des RT-Produkts zu 22,5 µl PCR-Mix gegeben. Der PCR-Mix enthielt: 2,5 µl Optiform Combi Pol Puffer (10 x), 1 µl Magnesiumchlorid (MgCl₂), final: 2 mM, 1 µl Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), final: je 100 µM, 1,25 µl Forward-Primer, final: 0,5 µM, 1,25 µl Reverse-Primer, final: 0,5 µM und 0,25 µl (1,25 U) Taq Polymerase. Tabelle 1 zeigt die Sequenz der Primer und die Länge der erwarteten Reaktionsprodukte.

Tabelle 1: Primersequenzen und PCR-Produktlängen

Gen	Primersequenzen		PCR-Produkt
p Collagen I α 2	forward	5' TTC CTG GTG CTA AGG GTG CTG 3'	120 bp
p Collagen I α 2	reverse	5' CAA GAC CTC TGG CAC CAG TAG 3'	
β -Actin	forward	5' AGG CCG GCT TCG CGG GCG AC 3'	245 bp
β -Actin	reverse	5' CTC GGG AGC CAC ACG CAG CTC 3'	

In dem auf 94 °C vorgeheizten „PTC-100TM Programmable Thermal Controller“ Thermocycler wurde eine initiale Denaturierung für 5 min durchgeführt. Zur Amplifikation eines definierten Collagen I α 2-Genfragments folgten 24 Zyklen von 1 min Denaturierung bei 93 °C, 30 s Anlagerung der Primer (Annealing) bei 60 °C, sowie einer Synthese (Elongation) von 30 s bei einer Temperatur von 72 °C. Beendet wurde die PCR mit einer Termination von 10 min bei einer Temperatur von 72 °C.

Bei der Amplifikation des β -Actin-Genfragments folgten auf die initiale Denaturierung 20 Zyklen von 1 min Denaturierung bei 93 °C, einer Primer-Anlagerung (Annealing) von 30 s bei 60 °C und einer Synthese (Elongation) von 30 s bei 72 °C. Auch im Fall der β -Actin-Gen Amplifikation erfolgte als letzter Schritt eine Inkubation von 10 min bei 72 °C. Als Positivkontrolle wurde in einem Ansatz anstatt des RT-Produkts eine 1:200 verdünnte Lösung einer früheren PCR des entsprechenden Gens eingesetzt.

2.3.5 Agarosegelelektrophorese und relative Quantifizierung der RT-PCR-Produkte

Zur optischen Darstellung wurden 10 μ l der PCR-Produkte mit 3 μ l 6 x Ladepuffer gemischt und in 1,8%-igen Agarosegelen inkl. 0,5 μ g/ml Ethidiumbromid in 1 x Tris-Acetate EDTA (TAE)-Puffer aufgetrennt. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte im elektrischen Feld innerhalb von 30 min bei einer Spannung von 90 V. Das Ergebnis der Gelelektrophorese wurde mithilfe eines „Biometra^R Transluminator TI 3“ mit UV-Licht einer Wellenlänge von 245 nm sichtbar gemacht, mit einer „Biometra^R BioDoc CCD-Camera“ aufgenommen und digital gespeichert.

Die Wanderung der Amplifikate im elektrischen Feld diente einerseits zur Trennung der spezifischen PCR-Produkte von Verunreinigungen wie Primerdimeren, die sich im Reaktionsgemisch befanden. Zum Anderen war die Wanderungsstrecke der Amplifikate abhängig von ihrer Länge. So konnte anhand einer „Leiter“ (100 bp „DNA-Ladder“) von DNA-Fragmenten definierter Länge, die parallel zu den Amplifikaten im Gel aufgetrennt wurden, die Länge der Reaktionsprodukte abgeschätzt werden. Die Quantifizierung der im Gel sichtbaren Banden erfolgte mittels des „TINA“-Computerprogramms. Dazu wurde das von der Kamera aufgenommene Bild vom „TINA“-Programm invertiert, d.h. es wurde das Negativ des originalen Bildes hergestellt. Die im UV-Licht weiß leuchtenden Banden erschienen nun schwarz und konnten quantifiziert werden. Um jede Bande wurde eine Region gleicher Größe definiert. Eine Region wurde im Bereich der Hintergrundfärbung angelegt. Das Computerprogramm maß darauf die optische Dichte (od) in der jeweiligen Region, subtrahierte die optische Dichte des Hintergrunds (Background, Bkg) und bezog das Ergebnis auf die Fläche (mm²) der Region. Vom Auswerter wurde eine Bande bzw. Region als Referenz (100%) ausgewählt und das „TINA“-Programm bezog alle übrigen Dichtewerte auf diese Vergleichsbande bzw. -region. So wurde in der weiteren Auswertung die optische Dichte abzüglich der Hintergrunddichte pro Quadratmillimeter gemessen und als Prozentwert der Referenzbande angegeben „%((od-Bkg)/mm²)“.

Zur Kontrolle der Quantifizierungsmethode wurden in einem Experiment die Produkte aus einer RT-PCR sowohl mit der Agarosegelelektrophorese als auch mit der Hochdruck-Flüssig-Chromatographie („high performance liquid chromatography“, HPLC) quantifiziert. Die HPLC wurde nach der PCR-HPLC-Methode in einer „Waters Alliance-Anlage SI 109/6“ durchgeführt. Als Ionenaustauscher wurde eine DEAE-NPR-Ionenaustauscher-(„Tosohaas“-)-Säule eingesetzt. Die Durchführung der HPLC übernahm freundlicherweise Herr Dipl.-Ing. B. Krüdwagen im Labor des Deutschen Herzzentrum Berlin.

2.3.6 Externe Standardisierung

Die externe Standardisierung diente einerseits zur Normalisierung der Daten auf die tatsächlich eingesetzte RNA-Menge. Das war notwendig, weil die RNA-Konzentrationsbestimmungen nicht absolut genau waren und schon geringfügig unterschiedliche Reinheiten der RNAs dazu führten, dass versehentlich unterschiedliche RNA-Mengen eingesetzt wurden. Es wurden daher nicht die Absolutwerte der synthetisierten cDNAs aus den verschiedenen Ansätzen verglichen, sondern es

wurden die relativen Werte, bezogen auf den externen Standard, untersucht. Andererseits war die externe Standardisierung dazu notwendig, eine Änderung des Collagen I α 2-mRNA-Gehalts im Verhältnis zur Gesamt-RNA-Menge zu betrachten. Notwendig war dies, um eine spezifische Wirkung der untersuchten Substanzen auf die Collagen I α 2-mRNA-Expression von einer unspezifischen Wirkung auf die gesamte Menge an zellulärer RNA abzugrenzen.

Als Referenzgen für die externe Standardisierung wurde in der vorliegenden Arbeit das β -Actin-Gen gewählt. Es handelte sich um ein Strukturgen des Zytoskeletts, dessen Expression weitgehend unabhängig von äußerer Stimulation war. Zur Auswertung wurde der Quotient aus der in der PCR gebildeten Collagen I α 2-cDNA und der entsprechenden β -Actin-cDNA berechnet.

2.4 Migrationsexperiment

Chemotaxis bezeichnet die gerichtete Bewegung von Zellen hin zu der Quelle eines „chemoattraktiven“ Stoffs [29]. Zur Untersuchung der Chemotaxis standen unterschiedliche Testsysteme, wie dreidimensionale Collagengele [88] und die modifizierte Boyden-Kammer zur Verfügung. Migrationsexperimente in der modifizierten Boyden-Kammer boten den Vorteil, die Migration von Zellen quantitativ bestimmen zu können [80]. Zwei übereinander befindliche Kammern wurden durch eine poröse Membran getrennt. Die Zellsuspension wurde in die obere Kammer, die chemotaktisch wirksame Substanz wurde in die untere Kammer gegeben. Es entstand ein Konzentrationsgradient von unten nach oben, wodurch sich die Zellen in Richtung auf die höhere Konzentration zubewegten. Auf Grund ihrer Größe konnten die Zellkerne die Membran nicht passieren und blieben in den Poren stecken. Nach Anfärbung der Zellkerne konnte die Migrationsrate anhand der in der Membran verbliebenen Zellkerne ermittelt werden.

Zur Vorbereitung der Migrationsexperimente wurden Polyethylene Terephthalate (PET)-Migrationskammern mit einer Porengröße von 8,0 μ m in 24-Lochplatten gegeben. Zur Beschichtung (Coating) der Membranen wurden die Kammern der 24-Lochplatten (untere Kammer) mit 700 μ l, die Migrationskammern (obere Kammer) mit 200 μ l Collagenlösung (gewonnen aus Rattenschwanz, 10 μ g/ml in H₂O) gefüllt und bei 4 °C über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Kammern für 1 h bei 37 °C mit einer Lösung von 1% „Bovines Serum Albumin“ (BSA) in PBS blockiert (Blocking). Währenddessen wurden die Fibroblasten, wie in Kapitel 2.3.1 beschrieben, von den Zellkulturschalen gelöst. Eingesetzt wurden nichttransduzierte, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierte Fibroblasten. Die

Zelldichte der Suspension wurde mittels eines Hämocytometers nach Neubauer ermittelt. Das Produkt aus dem Mittelwert von acht ausgezählten Quadranten und dem Faktor 10^4 ergab die Zelldichte der Suspension (Zellen/ml).

Zur Durchführung des Migrationsexperiments wurden die unteren Kammern mit 700 µl Hungermedium (Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (DMEM) incl. 0,4% fetales Kälberserum (FKS), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 2 mM L-Glutamin und 10 mM Hepes-Pufferlösung) gefüllt. In die oberen Kammern wurden 50.000 Zellen, suspendiert in 200 µl Hungermedium, gegeben. Nach einer Adhäsionsphase von 30 min bei 37 °C wurde Ang II oder „human platelet derived growth factor-BB“ (hPDGF-BB) oder die Kombination von beiden so zugegeben, dass Ang II in einer finalen Konzentration von 1 µM und hPDGF-BB in einer finalen Konzentration von 20 ng/ml vorlag. Jede Stimulation wurde in einem „checkerboardartigen“ Aufbau durchgeführt. Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau der Migrationsexperimente. Dabei war die erste Migrationskammer der Kontrollansatz, bei der in beide Kammern Hungermedium gegeben wurde. Der zweite Ansatz zeigt die Migration der Zellen entlang des Konzentrationsgradienten. Hier wurde Ang II, hPDGF-BB bzw. Ang II plus hPDGF-BB in die untere Kammer gegeben, so dass es in den o.g. Konzentrationen vorlag. In die obere Kammer wurde Hungermedium zum Volumenausgleich gegeben. In der dritten Kammer war die Anordnung umgekehrt und in der vierten Migrationskammer wurden Ang II, hPDGF-BB bzw. Ang II plus hPDGF-BB sowohl in die obere als auch in die untere Kammer gegeben. Die Migration in der dritten und vierten Kammer zeigte dabei einen chemokinetischen Effekt, d.h. eine ungerichtete Erhöhung der Motilität, an. Die Migration erfolgte über 4 h bei 37 °C. Anschließend wurde das Medium und die nicht adhärenen Zellen entfernt, die adhärenen und migrierten Zellen wurden mit kaltem Methanol über Nacht bei -20 °C fixiert und mit Mayers Hämalaunlösung gefärbt. Die in den Poren befindlichen Zellkerne aus 8 Gesichtsfeldern wurden bei 200-facher Vergrößerung gezählt und die Anzahl der gegen den Konzentrationsgradienten migrierten Zellen wurde in Beziehung zur Anzahl der im Kontrollansatz migrierten Zellen gesetzt. Das Ergebnis wurde in Prozent angegeben.

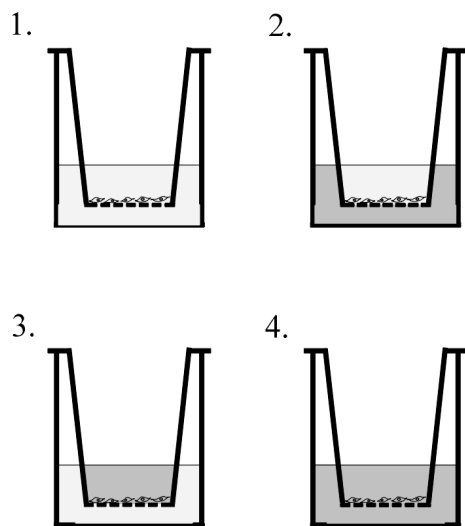
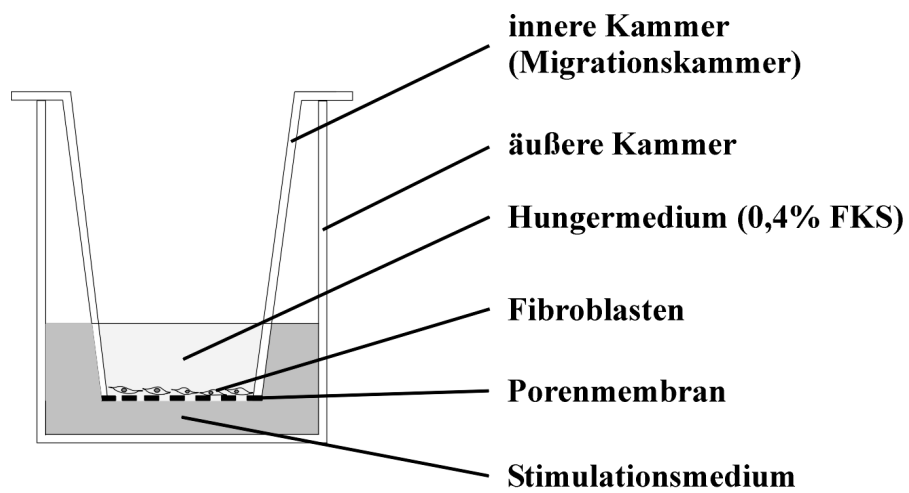


Abbildung 4: Schematischer Aufbau des Migrationsversuchs

„Checkerboardartige“, schachbrettartige, Versuchsanordnung

FKS: Fetales Kälberserum

2.5 Statistik

Alle Werte geben, wenn nicht anders gekennzeichnet, Mittelwerte (MW) an. Fehlerindikatoren in den Diagrammen geben die Standardfehler (SEM, „standard error of the mean“) an. Mithilfe des Student'schen t-Tests wurden die Mittelwerte aus der Quantifizierung der RT-PCRs und die Ergebnisse aus den Migrationstests untersucht. Verwendet wurden einseitige t-Tests vom Typ 2 (ungepaart, gleiche Varianz). Differenzen der Mittelwerte mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen. Zur graphischen Darstellung und zur statistischen Auswertung wurden die Computerprogramme: „Corel Draw 7“, „Microsoft Excel 97“ und „Microsoft Word 97“ benutzt.

3 Ergebnisse

3.1 Validierung der Methoden

3.1.1 Isolierung, Kultivierung und Nachweis von Fibroblasten

Durch die Inkubation der Proben aus porcinen Herzen mit einem Gemisch aus Collagenase, Trypsin und Dispase nach dem o.g. Protokoll [74] konnten Zellen isoliert werden. Neuß et al. hatten gezeigt, dass mit dieser Methode Fibroblastenzellkulturen mit einem Reinheitsgrad von 95–97% gewonnen werden konnten. Bei den übrigen Zellen handelte es sich zumeist um glatte Gefäßmuskelzellen (VSMC) und um Perizyten. Nach 2 bis 5 Tagen waren kleine Zellverbände mikroskopisch sichtbar. Die Morphologie der Zellkulturen war ein Kriterium zur Bestimmung der Zelltypen. Die hier gefundenen Zellen verfügten über eine spindelförmige Gestalt und lagen in einer Einzellschicht („monolayer“) vor. Die spindelförmige Gestalt war typisch für Zellkulturen aus Fibroblasten [12]. Mehrschichtige Zellschichten („multiple cell layers“) wären bei glatten Gefäßmuskelzellen zu erwarten gewesen und eine „kopfsteinpflasterartige“ Zellschicht wäre typisch für Endothelzellen gewesen [12]. Ein sicheres Kriterium zur Bestimmung von Zelltypen und Reinheit der Zellkultur stellte die immunhistochemische Färbung dar. Die hier gezeigte positive Anfärbbarkeit mit monoklonalen Anti-Vimentin-Antikörpern (siehe Abbildung 5) und die fehlende Anfärbbarkeit mit Anti-von-Willebrand-Faktor-Antikörpern zeigte, dass es sich hier um eine Fibroblastenzellkultur mit einem Reinheitsgrad von über 97% handelte. Durch wöchentliche Aufteilung der Zellkulturen im Verhältnis 1:3 bis 1:5 war es möglich, ausreichend viele Fibroblasten zu erhalten. Die Zellen wurden vor Erreichen der Konfluenz passagiert, so dass eine Selektion von Zellen mit gestörter Kontaktinhibition verhindert wurde. In höheren Passagen hätte es sonst, z.B. durch Herabregulation der AT1-Rezeptoren, zum Verlust zelltypspezifischer Eigenschaften kommen können. Um dies zu vermeiden, wurden Zellen aus der vierten bis sechsten Passage verwendet. Porcine kardiale Fibroblasten entdifferenzierten in der Zellkultur weniger schnell verglichen mit humanen kardialen Fibroblasten, die bis zur zweiten Passage differenziert blieben [74], danach schnell degenerierten, sich abrundeten und AT1 auf Proteinebene herabregulierten [51]. Die in der vorliegenden Arbeit benutzten Fibroblasten exprimierten bis über die achte Passage hinaus AT1 in hoher Quantität und behielten die charakteristische spindel- bzw. sternförmige Gestalt.

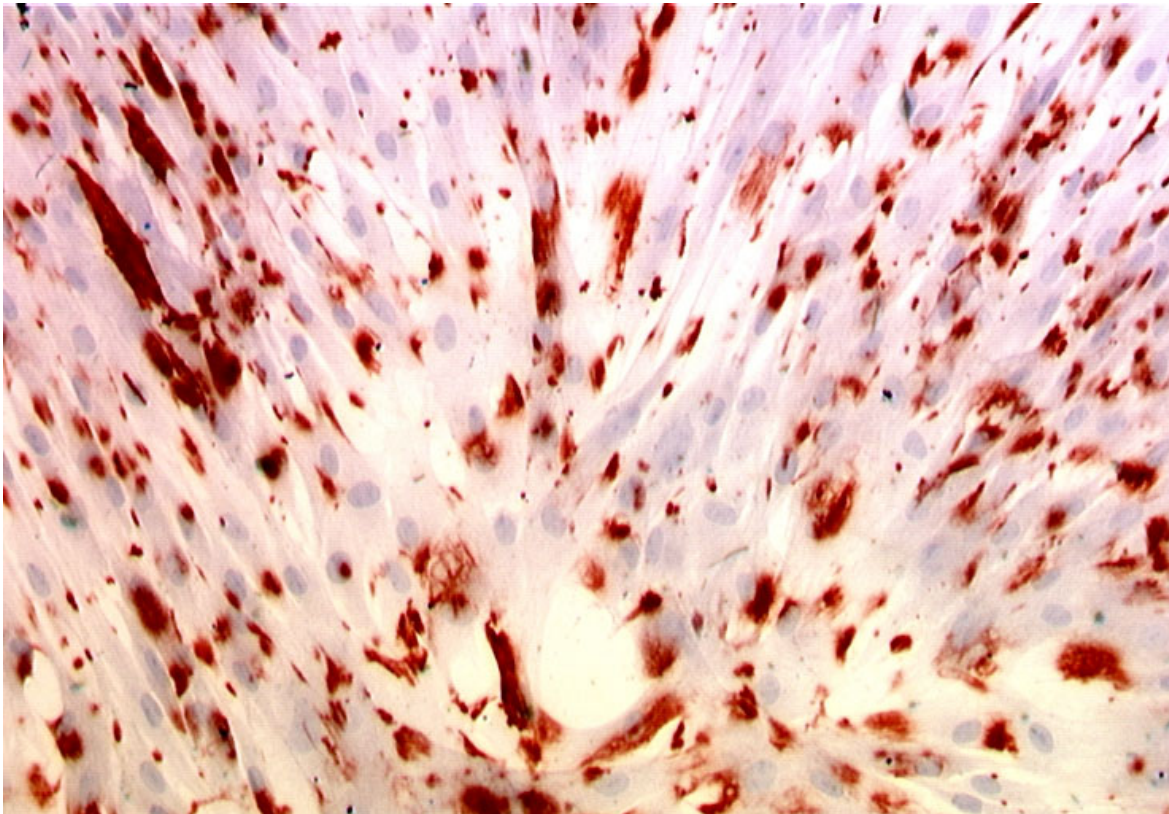


Abbildung 5: Immunhistochemische Anfärbung von porcinen kardialen Fibroblasten mittels Anti-Vimentin-Antikörpern

aufgenommen bei 100-facher Vergrößerung, Gegenfärbung mit Hämatoxylin

3.1.2 Feststellung der Transduktionseffizienz mittels eines adenoviralen β -Galaktosidasevektors (Ad5LacZ)

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Ermittlung der Transduktionseffizienz der adenoviralen Vektoren in den Fibroblasten der adenovirale β -Galaktosidaseexpressionsvektor, Ad5LacZ, eingesetzt. Die Transduktionseffizienz beim β -Galaktosidasevektor konnte als Indikator für die Transduktionseffizienz beim Ad5AT2- bzw. beim Antisense-(Ad5TA2)-Vektor gelten, da alle drei Vektoren das gleiche Grundgerüst besaßen und die verwendeten Zellen aus derselben Zellkultur stammten. Abbildung 6a zeigt das mikroskopische Bild einer Fibroblastenzellkultur nach X-Gal-Einzelzellfärbung und Abbildung 6b zeigt eine nichttransduzierte Zellkultur. Ad5LacZ-infizierte Zellen exprimierten die β -Galactosidase zytoplasmatisch und setzten das Substrat X-Gal in einen blauen Indigofarbstoff um. Daraus resultierte im Zellplasma eine deutlich sichtbare Blaufärbung. Der Anteil von etwa 90% angefärbten Fibroblasten zeigte, dass die Transduktion mit einer guten Effizienz durchgeführt wurde. Es war daher bei den Transduktionen mit Ad5AT2 und Ad5TA2 auch mit einem Anteil von etwa 90% erfolgreich adenoviral transduzierter Fibroblasten zu rechnen. Die adenovirale Transduktion stellte sich damit als eine geeignete Methode heraus, eine AT2-Überexpression der Fibroblasten zu gewährleisten. Die tatsächliche AT2-Expression musste in Bindungsstudien nachgewiesen werden.

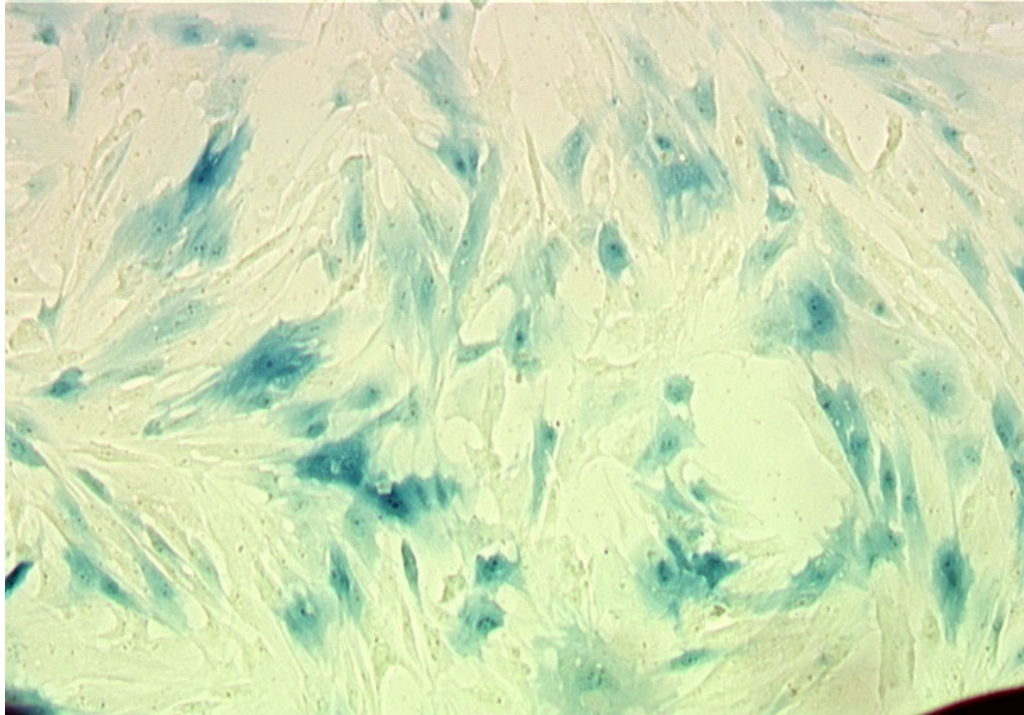


Abbildung 6a: X-Gal-Einzelzellfärbung – Fibroblastenzellkultur nach Transduktion mit adenoviralen b-Galactosidasevektoren

aufgenommen bei 100-facher Vergrößerung

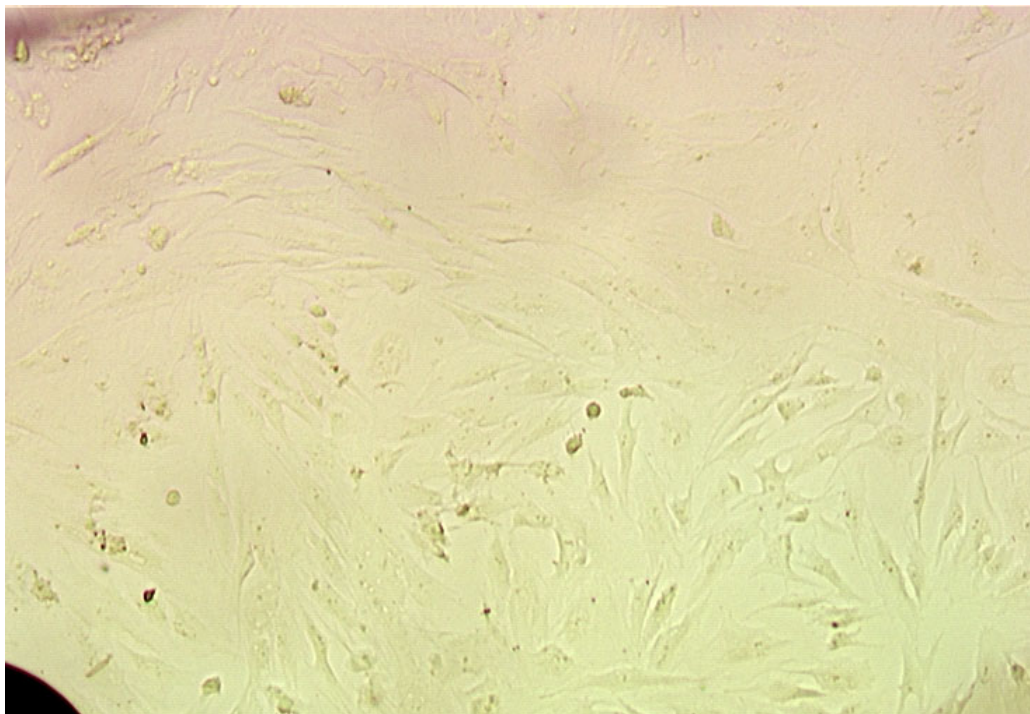


Abbildung 6b: X-Gal-Einzelzellfärbung – nichttransduzierte Fibroblastenzellkultur

aufgenommen bei 100-facher Vergrößerung

3.1.3 Expression von Ang II-Rezeptoren in nativen und transduzierten Fibroblasten

Die Abbildungen 7 und 8 zeigen die Ergebnisse der Bindungsstudien von nichttransduzierten, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten mit radioaktiv markiertem [125 I]-(Sar1, Ile8)-Ang II. Bei den nichttransduzierten Fibroblasten erreichte die Gesamt-[125 I]-(Sar1, Ile8)-Ang II-Bindung einen Wert von ca. 1000 cpm (Anzahl gemessener Impulse pro Minute) und der Anteil der unspezifischen Bindung betrug dabei ca. 20% der gesamten [125 I]-(Sar1, Ile8)-Ang II-Bindung. Nahezu die gesamte spezifische Ang II-Bindung war mit dem AT1-Antagonisten Irbesartan (1 μ M) zu verdrängen, während der AT2-Antagonist PD 123319 zu keiner signifikanten und konzentrationsabhängigen Verdrängung der [125 I]-(Sar1, Ile8)-Ang II-Bindung führte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die nicht-transduzierten, porcinen kardialen Fibroblasten AT1-Rezeptoren, aber keine AT2-Rezeptoren exprimierten.

Die Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten banden radioaktiv markiertes Ang II mit einer Gesamtaktivität von ca. 3700 cmp, was auf eine deutlich höhere Ang II-Rezeptorexpression als bei nativen Fibroblasten schließen ließ. Die unspezifische Bindung des radioaktiv markierten Ang II betrug hier ca. 5%. Die Vorbehandlung der Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten mit Irbesartan zeigte einen Anteil von ca. 13% AT1-Rezeptoren an den gesamten Ang II-Rezeptoren. Bei Zugabe des AT2-Liganden CGP 42112 war dagegen die [125 I]-(Sar1, Ile8)-Ang II-Bindung deutlich geringer als bei der Kontrolle und bei der Irbesartan-Vorbehandlung. Die Differenz zur Kontrolle entsprach einem Anteil von ca. 78% AT2-Rezeptoren an der gesamten Ang II-Bindung und zeigte damit eine sechsfach höhere AT2- als endogene AT1-Expression. Die zur Gesamtaktivität fehlende Aktivität ist durch unterschiedliche Affinitäten der kalten und des radioaktiven Liganden zu den ATR und durch Meßungenauigkeiten zu erklären. Der Vergleich der Kontrolluntersuchung von Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten zeigte, dass in den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten keine AT2-spezifische Ang II-Bindung nachzuweisen war. Da die Expression des AT2-Rezeptors unter der Kontrolle des CMV-Promotors stand, wurde sie durch Serum und Wachstumsfaktoren heraufreguliert. Serumentzug (durch Hungermedium mit 0,4% FKS) reduzierte die AT2-Expression um ca. 30% (nicht gezeigt).

Bei der Betrachtung der Bindungsstudien musste berücksichtigt werden, dass diese Experimente keine Aussage darüber machen, ob das AT2-Rezeptorprotein vollständig exprimiert wurde, da für die Ang II-Bindung der intrazelluläre Bereich des Rezeptors nicht nötig war und ob die überexprimierten AT2-Rezeptoren funktionell an Signaltransduktionswege gekoppelt waren.

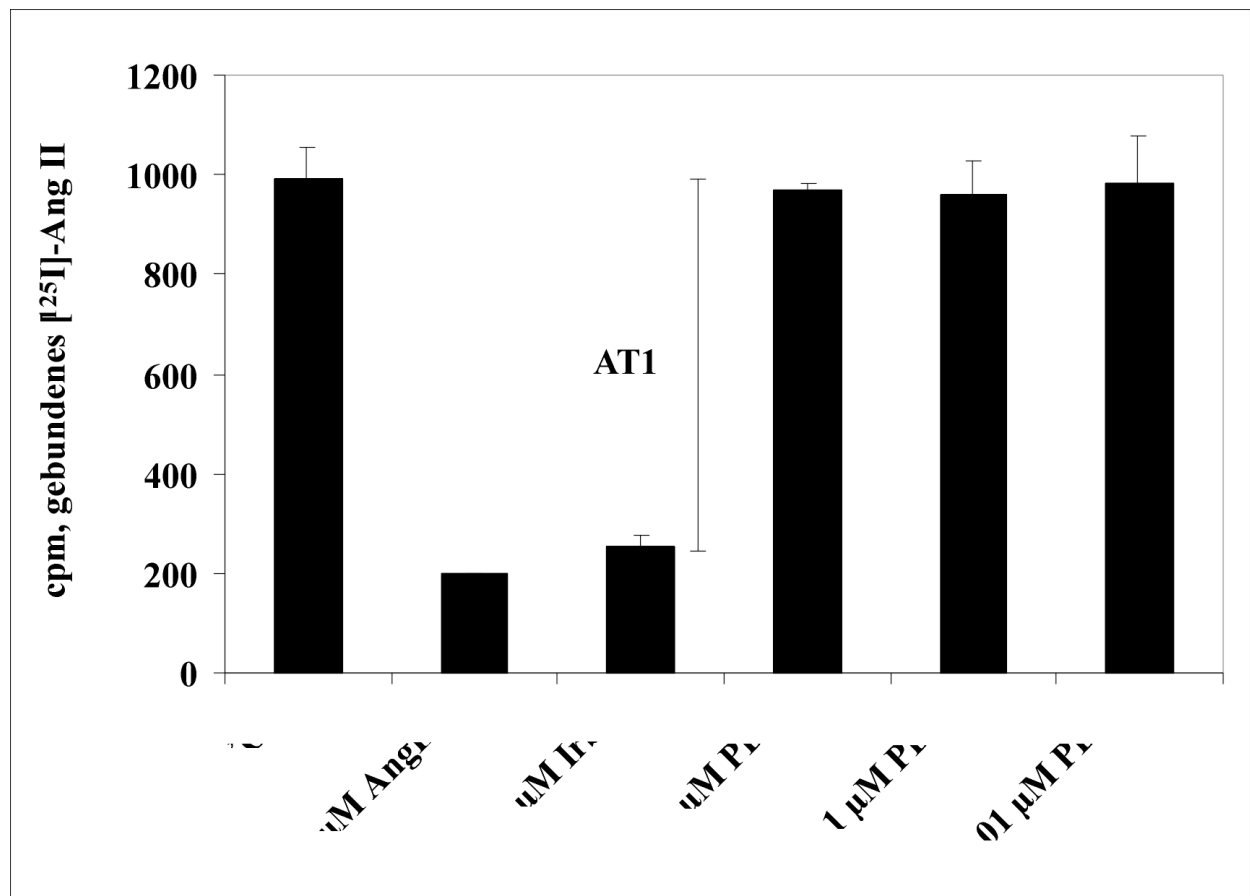


Abbildung 7: Bindungsstudie von nativen, nichttransduzierten, kardialen Fibroblasten mit $[^{125}\text{I}]\text{-(Sar 1, Ile 8)-Angiotensin II}$

n = 2

$[^{125}\text{I}]\text{-Ang II}$: $[^{125}\text{I}]\text{-(Sar 1, Ile 8)-Angiotensin II}$

Ang II: Angiotensin II

Cpm: „Counts per minute“, Anzahl der gemessenen Impulse pro Minute

Irb: Irbesartan, spezifischer Angiotensin II Typ 1-Rezeptorantagonist

KO: Kontrollansatz

μM : Mikromolar (Mikromol pro Liter)

n: Anzahl der Experimente

PD: PD123319, spezifischer Angiotensin II Typ 2-Rezeptorantagonist

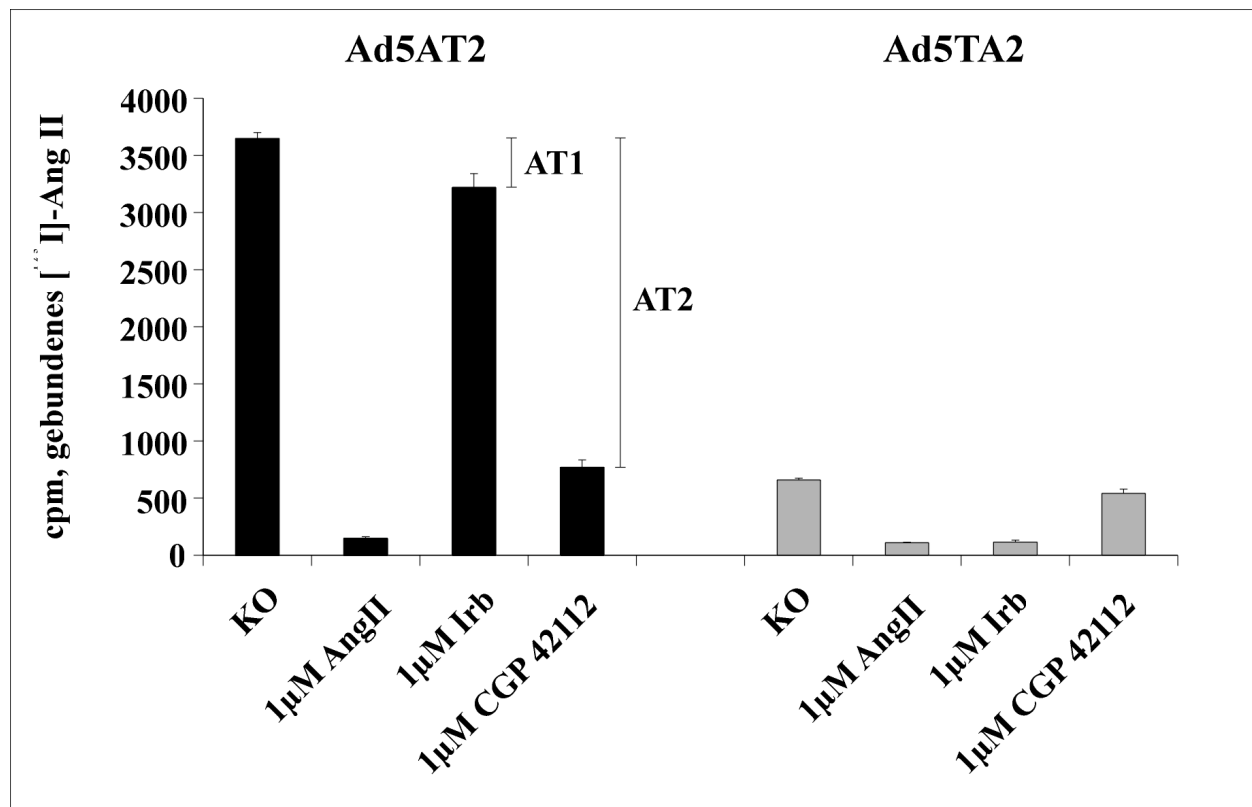


Abbildung 8: Nachweis der AT2-Expression in Ad5AT2- bzw. Ad5TA2-transduzierten, kardialen Fibroblasten mittels [125I]-(Sar 1, Ile 8)-Angiotensin II Bindungsstudie

m.o.i.=100, n=2

[125I]-Ang II	[125I]-(Sar 1, Ile 8)-Angiotensin II
Ad5AT2	Adenovirale Transduktion des AT2-Gens
Ad5TA2	Adenovirale Transduktion des „Antisense-AT2-Gens“
Ang II	Angiotensin II
AT1	Angiotensin II Typ 1 Rezeptor
AT2	Angiotensin II Typ 2 Rezeptor
CGP 42112	AT2-Rezeptor-spezifischer Ligand
cpm	„Counts per minute“, Anzahl der gemessenen Impulse pro Minute
Irb	Irbesartan, spezifischer Angiotensin II Typ 1-Rezeptorantagonist
KO	Kontrollansatz
m.o.i.	„Multiplicity of infection“, Anzahl infektiöser Partikel pro Zelle
µM	Mikromolar (Mikromol pro Liter)
n	Anzahl der Experimente

3.2 Semiquantitative Bestimmung von Collagen I α 2-mRNA

3.2.1 Validierung der Agarosegelelektrophorese zur semiquantitativen Bestimmung der Collagen I α 2-mRNA

Die Ergebnisse der Agarosegelelektrophorese mit anschließender densitometrischer semiquantitativer Quantifizierung wurden mit denen der HPLC verglichen. Die Auswertung der RT-PCR mit beiden Methoden ist in Abbildung 9 und 10a dargestellt. Es wurden dazu Zyklusprofile der Collagen I α 2-PCR in Bereichen von 22 bis 28 Zyklen verglichen. Die PCR erfolgte bei Auswertung mittels der HPLC mit einer Effizienz von 0,553. Bei der entsprechenden Auswertung mittels Agarosegelelektrophorese und semiquantitativer densitometrischer Auswertung wurde eine PCR-Effizienz von 0,434 festgestellt. Auf Grund übereinstimmender Kurvenverläufe und vergleichbarer PCR-Effizienzen wurde die Agarosegelelektrophorese mit densitometrischer semiquantitativer Quantifizierung für die Auswertung der weiteren Experimente eingesetzt.

3.2.2 Optimierung der RT-PCR durch Auswertung von Zyklusprofilen

Zum Vergleich der RT-PCR von Collagen I α 2- und β -Actin-mRNA wurden PCR-Zyklusprofile in Bereichen von 22 bis 28 bzw. 20 bis 29 Zyklen erstellt. Die Ergebnisse sind in den Abbildungen 10a und 10b dargestellt. Die PCR-Effizienz der Collagen I α 2-PCR betrug 0,434; die entsprechende Effizienz der β -Actin-PCR lag bei einem Wert von 0,312. Die Abbildung 11 zeigt das Bild einer Agarosegelelektrophorese von Collagen I α 2-cDNA im Bereich von 18 bis 36 Zyklen. Die densitometrische Quantifizierung der RT-PCR-Produkte ergab, dass die Konzentration der gebildeten Amplifikate der Collagen I α 2-cDNA in einem Bereich zwischen 18 und 26 Zyklen kontinuierlich anstieg und erst bei höheren Zyklenzahlen in eine Plateauphase überging (siehe Abbildung 12). Die weiteren RT-PCRs der Collagen I α 2-cDNA wurden mit einer Zyklusanzahl von 24 Zyklen durchgeführt und lagen damit im Bereich des kontinuierlichen Anstiegs der PCR-Produkte. Für die PCR des β -Actin-Gens wurde eine optimale Zyklusanzahl von 20 Zyklen ermittelt.

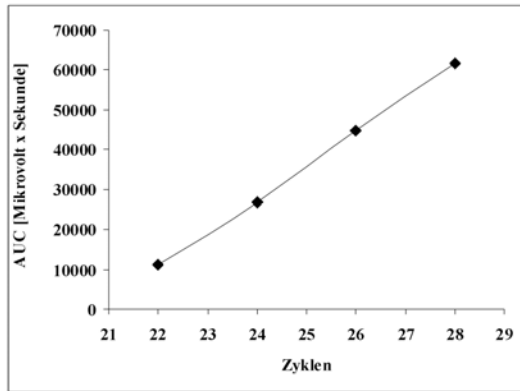


Abbildung 9: Zyklusprofil der PCR; Quantifizierung der Collagen I α 2-Produkte mittels HPLC

AUC: „Area under the curve“, Fläche unter der Kurve

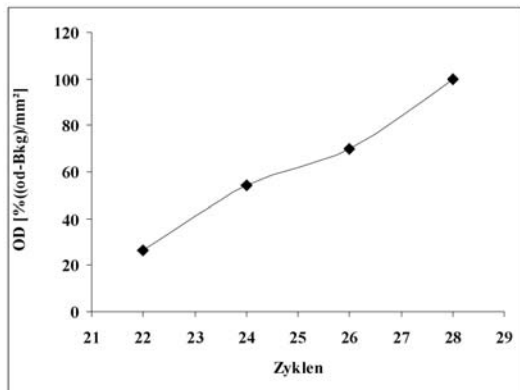


Abbildung 10a: Zyklusprofil der PCR; Quantifizierung des Collagen I α 2-PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

OD: Opische Dichte abzüglich Hintergrunddichte pro mm²

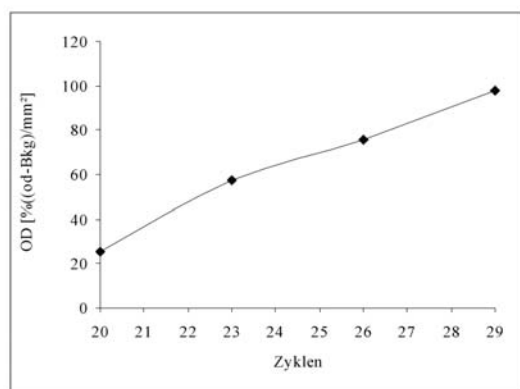


Abbildung 10b: Zyklusprofil der PCR, Quantifizierung der β -Actin-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

OD: optische Dichte abzüglich der Hintergrunddichte pro mm²

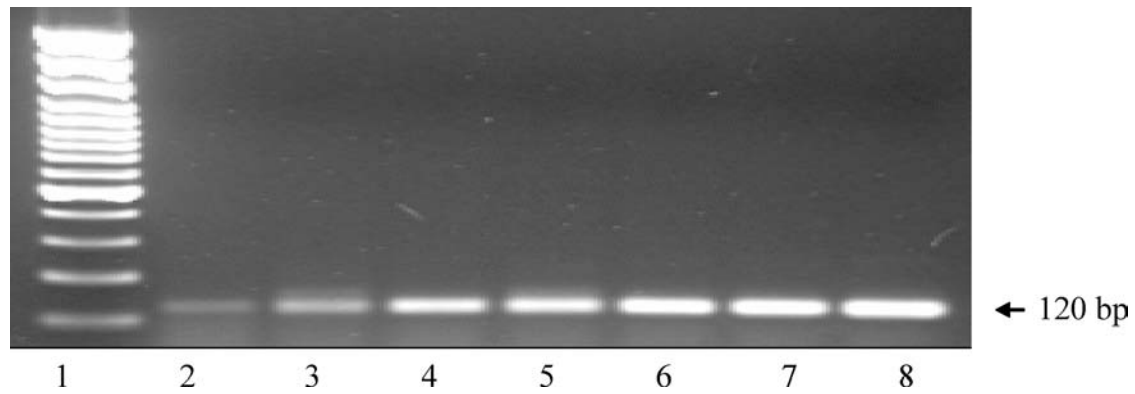


Abbildung 11: Agarosegelelektrophorese eines Zyklusprofils einer Collagen I α 2-RT-PCR

Spur 1	100 bp Leiter
Spur 2	18 Zyklen
Spur 3	22 Zyklen
Spur 4	24 Zyklen
Spur 5	26 Zyklen
Spur 6	28 Zyklen
Spur 7	32 Zyklen
Spur 8	36 Zyklen

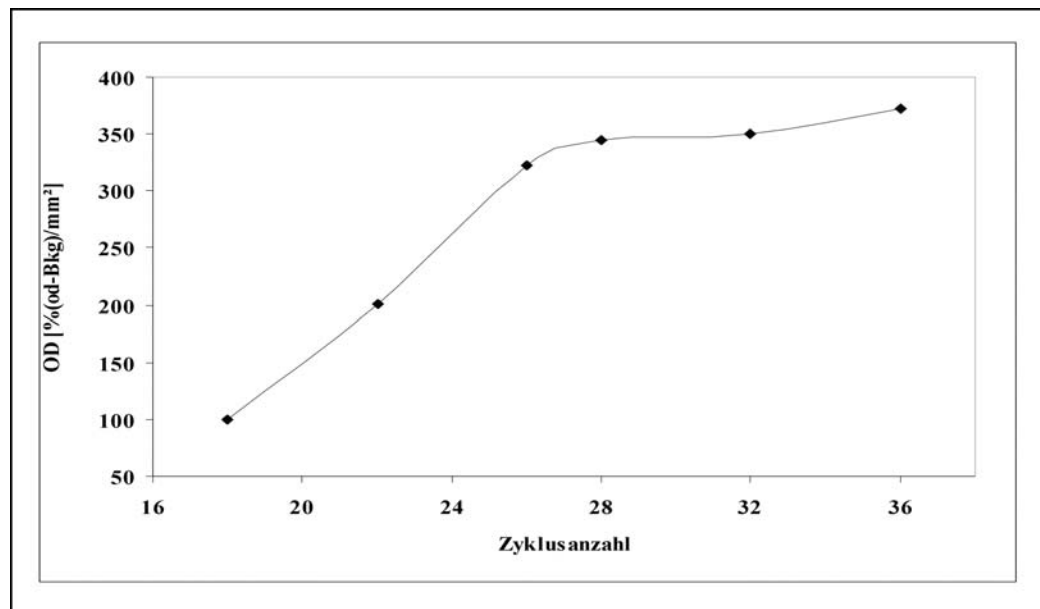


Abbildung 12: Ergebnis der densitometrischen Quantifizierung des Zyklusprofils einer Collagen I α 2-RT-PCR

OD: Prozentuale Optische Dichte abzüglich der Hintergrunddichte pro mm²

3.2.3 Relative Quantifizierung des Collagen I α 2-mRNA-Gehalts in Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten stimulierten Fibroblasten

Untersucht wurde in einer Reihe von 3 bis 5 Experimenten der Effekt von Ang II auf den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt in AT2-überexprimierenden und mit „Transforming growth factor- β_1 “-(TGF- β_1)-stimulierten Fibroblasten. Um einen möglichen Einfluss von Serumfaktoren auf die Collagen-mRNA-Expression auszuschalten, wurden die Zellen 24 h nach der adenoviralen Transduktion für 24 h ausgehungert (Reduktion des FKS-Anteils im Medium auf 0,4%). Da in vorhergehenden Untersuchungen an isolierten humanen kardialen Fibroblasten festgestellt wurde, dass Ang II über den AT1-Rezeptor keinen signifikanten Effekt auf die Collagen-mRNA-Expression hatte [57], sollte hier der Einfluss von AT2 auf die TGF- β_1 -stimulierten Collagen-mRNA-Gehalte untersucht werden. Mögliche AT1-Effekte wurden durch 30-minütige Vorinkubation mit dem AT1-Rezeptorblocker Irbesartan (10 μ M) verhindert. Untersucht wurde der relative Collagen I α 2-mRNA-Gehalt von Fibroblasten, die mit TGF- β_1 (10 ng/ml für 24 h), alleine, bzw. mit TGF- β_1 und Ang II (10 ng/ml und 1 μ M für 24 h) stimuliert wurden. Als Kontrollansatz dienten Fibroblasten, die ausschließlich mit 10 μ M Irbesartan (Irb) für 30 min behandelt wurden. In einem zweiten Ansatz wurden die Fibroblasten wie oben mit Irbesartan vorinkubiert und dann mit 10 ng/ml TGF- β_1 für 24 h stimuliert. Im dritten Ansatz wurde zusätzlich zu der im zweiten Ansatz beschriebenen Stimulation 1 μ M Ang II zugegeben und für 24 h stimuliert. Dieser Ansatz sollte die Hypothese, dass Ang II über den AT2-Rezeptor die TGF- β_1 -stimulierte Collagen I α 2-mRNA-Synthese reduziert und so antifibrotisch wirken kann, klären.

In AT2-exprimierenden Fibroblasten ergab ein Vergleich der Quotienten aus Collagen I α 2-mRNA-Gehalt und β -Actin-mRNA-Gehalt, dass TGF- β_1 den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt gegenüber der Kontrolle nicht signifikant änderte ($0,947 \pm 0,044$ vs. 1,000, $n=3-5$). Die zusätzliche Stimulation von Fibroblasten mit Ang II über den AT2-Rezeptor veränderte die Collagen I α 2-mRNA-Expression der TGF- β_1 -stimulierten Fibroblasten nicht signifikant gegenüber der Kontrolle ($0,947 \pm 0,102$ vs. 1,000, $n=5$), bzw. bewirkte keine Änderung gegenüber der ausschließlichen TGF- β_1 -Stimulation ($0,947 \pm 0,102$ vs. $0,947 \pm 0,044$, $n=3-5$). Da durch die Zugabe von Irbesartan die vorhandenen AT1-Rezeptoren blockiert und damit die AT1-vermittelte Ang II-Wirkung verhindert wurde, könnte es sich um eine tendenzielle Hemmung der

TGF- β_1 -induzierten Collagen I α 2-mRNA durch das Vorhandensein von AT2 handeln (siehe Abbildung 13).

In den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten erhöhte in diesen Experimenten die Stimulation mit TGF- β_1 den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt bezogen auf die β -Actin-mRNA-Expression verglichen mit der Kontrolle nicht signifikant um einen Faktor von $1,157 \pm 0,147$ ($n=3-5$). Die Stimulation mit TGF- β_1 plus Angiotensin II änderte in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten den Collagen I α 2-mRNA/ β -Actin-mRNA-Quotienten nicht signifikant gegenüber der Kontrolle ($0,966 \pm 0,111$ vs. $1,000$, $n=5$) und senkte den Collagen I α 2-mRNA/ β -Actin-mRNA-Quotienten gegenüber der alleinigen Stimulation mit TGF- β_1 um 19,1% (bzw. um einen Faktor von $0,966 \pm 0,111$ vs. $1,157 \pm 0,147$, $n=3-5$). Beim direkten Vergleich zwischen TGF- β_1 -stimulierten Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten zeigte sich eine nicht signifikante Steigerung des Collagen I α 2/ β -Actin-mRNA-Quotienten in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten um 21,0% (bzw. um einen Faktor von $1,157 \pm 0,147$ vs. $0,947 \pm 0,044$, $n=3$). Bei Stimulation mit TGF- β_1 plus Ang II zeigte der Vergleich zwischen Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten keinen signifikanten Unterschied im Collagen I α 2/ β -Actin-mRNA-Quotienten ($0,947 \pm 0,102$ vs. $0,966 \pm 0,111$, $n=5$).

Zusammengefasst zeigen die vorliegenden Ergebnisse, dass durch Stimulation mit TGF- β_1 und Ang II in Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten keine spezifische Änderung des Collagen I α 2-mRNA-Gehalts nachgewiesen werden konnte. In den Ad5AT2-transduzierten Zellen ergab sich eine Tendenz zur Herabregulation der relativen Collagen I α 2-mRNA-Expression durch TGF- β_1 ; in den Ad5TA2-transduzierten TGF- β_1 -stimulierten Fibroblasten war dieser Effekt aufgehoben.

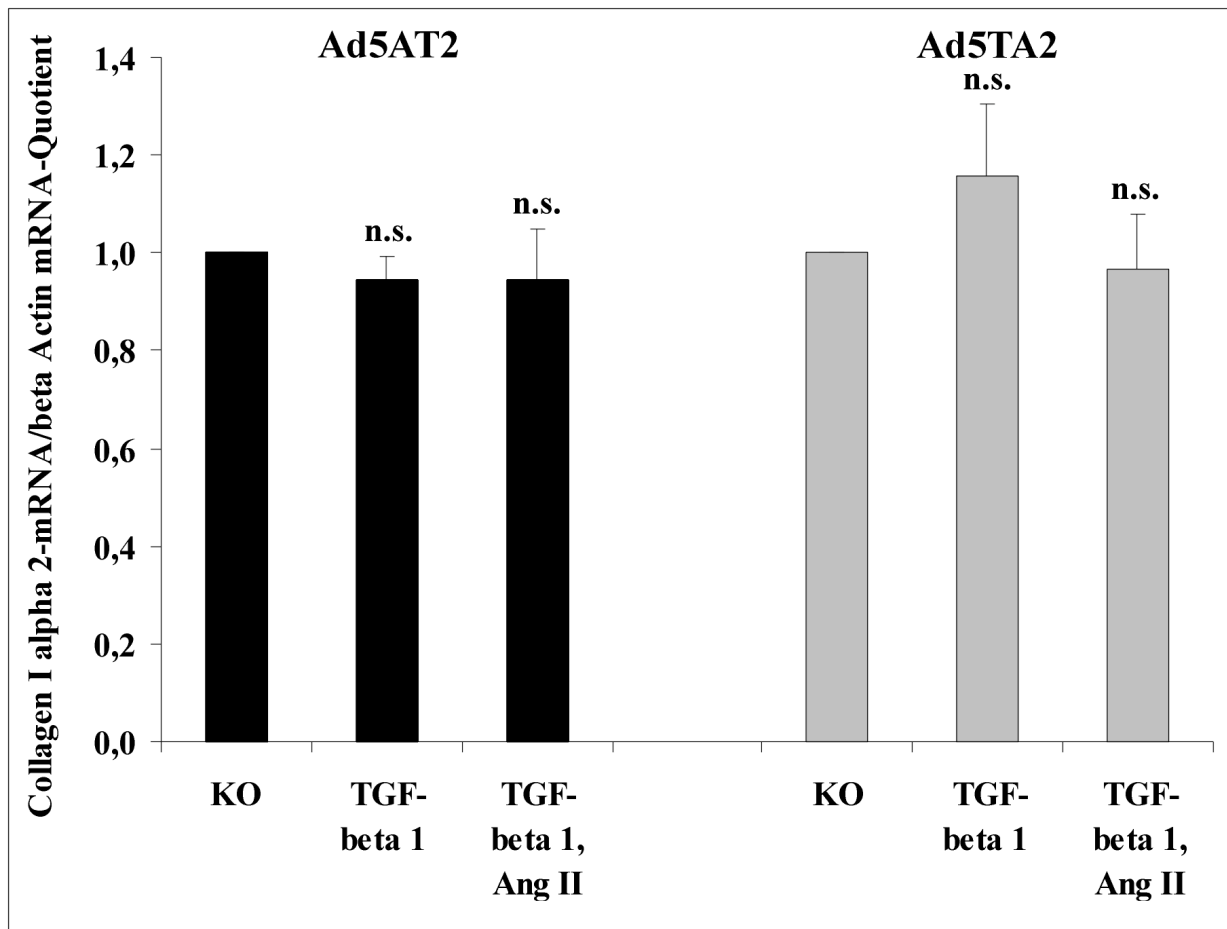


Abbildung 13: Collagen I α 2-mRNA-Gehalt im Verhältnis zum β -Actin-mRNA-Gehalt in Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten

n=3-5

- Ad5AT2: Ad5AT2-transduzierte Fibroblasten
- Ad5TA2: Antisense-(Ad5TA2)-transduzierte Fibroblasten
- Ang II: Angiotensin II, 1 μ M
- KO: Kontrollansatz, 0,4 % fetales Kälberserum, 10 μ M Irbesartan
- n.s.: Nicht signifikant gegenüber jeweiliger KO
- TGF-beta 1: „Transforming growth factor- β_1 ”

3.3 Migration porciner kardialer Fibroblasten

3.3.1 Validierung des Migrationsexperiments durch Stimulation nichttransduzierter Fibroblasten mit hPDGF-BB

Zur Validierung der Migrationsexperimente wurden 4 bis 9 Migrationsexperimente mit jeweils zwei Ansätzen durchgeführt. In beiden Ansätzen wurden nichttransduzierte porcine kardiale Fibroblasten aus denselben Zellkulturen über eine Dauer von vier Stunden mit hPDGF-BB in einer Konzentration von 20 ng/ml stimuliert. Die chemotaktische Wirkung von hPDGF-BB wurde von anderen Arbeitsgruppen in Experimenten mit kardialen Rattenfibroblasten [31] sowie mit cornealen Fibroblasten [50] und glatten Gefäßmuskelzellen [32] nachgewiesen. In den Vorexperimenten dieser Arbeit wurden in jeweils einem Ansatz die Experimente nach dem oben beschriebenen Protokoll (siehe Kapitel 4.2) durchgeführt; in dem jeweils anderen Ansatz wurden nach der Migrationsphase die oben auf der Membran adhärenen Fibroblasten mit einem Watteträger vorsichtig entfernt. Diese Experimente sollten klären, ob die Entfernung der auf der Membran aufliegenden, aber nicht transmigrierten Zellen eine eindeutigere Auszählbarkeit und damit eine bessere Auswertung der Experimente ermöglichte. Zur Auswertung wurden die in den Membranporen befindlichen Zellkerne in acht Gesichtsfeldern ausgezählt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der Ansätze zu erreichen, wurde die Anzahl der ausgezählten Zellkerne in Beziehung gesetzt zu der Anzahl der in den Kontrollen (obere Kammer: HM, untere Kammer: HM) migrierten Zellen und als Prozentwert angegeben. In dem Ansatz mit Entfernung der oben adhärenen Zellen erhöhte hPDGF-BB die Migration der Fibroblasten gegenüber den Kontrollen auf $387 \pm 152\%$ ($n=4$, n.s.). Wegen relativ großer Schwankungen der Werte in den Experimenten waren die Differenzen zwischen Kontrolle und Stimulation nicht signifikant. In der Vergleichsuntersuchung ohne Entfernung der oben adhärenen Zellen erhöhte hPDGF-BB die Migration der Fibroblasten gegenüber der Kontrolle signifikant auf $147 \pm 26\%$ ($n=9$, $p<0,01$) (siehe Abbildung 14b). Die Auswertung ergab bei den Experimenten ohne Entfernung der adhärenen Zellen kleinere Standardabweichungen und kleinere p-Werte ($p=0,0088$ (ohne Zellentfernung) vs. $p=0,0933$ (mit Zellentfernung)). Dies zeigt, dass die Einzelexperimente ohne Zellentfernung eine kleinere Streuung aufwiesen und vermutlich die Migration der Zellen korrekter darstellen. Es wurde daher für die weiteren Migrationsexperimente eine Auswertung ohne die Entfernung der auf der Membran adhärenen Zellen vorgenommen (siehe Abbildung 14a).

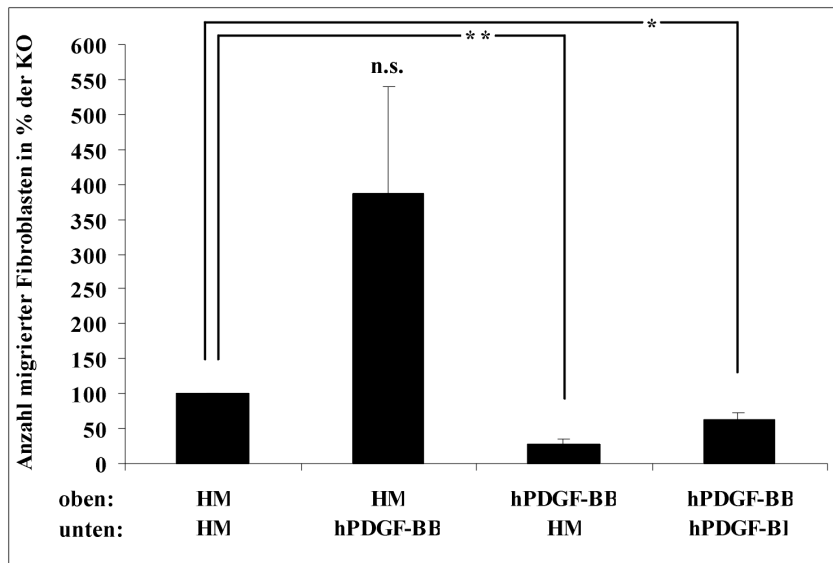


Abbildung 14a: Migration nichttransduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit hPDGF-BB mit Entfernung auf der Membran befindlicher Fibroblasten

n=4

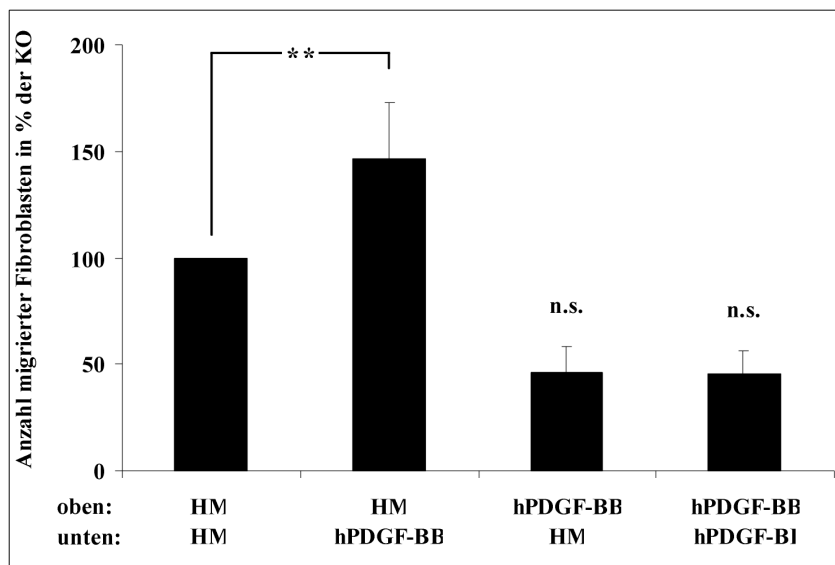


Abbildung 14b: Migration nichttransduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit hPDGF-BB ohne Entfernung auf der Membran befindlicher Fibroblasten

n=9

- HM: Hungermedium, incl. 0,4% fetales Kälberserum
 HPDGF-BB: „Human platelet derived growth factor BB-Homodimer“
 KO: Kontrolle (oben HM, unten HM)
 n: Anzahl der Versuche
 n.s.: Nicht signifikant gegenüber Kontrolle (oben HM, unten HM)

*: p<0,05

**: p<0,01

3.3.2 Migration nichttransduzierter, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit hPDGF-BB

Um die Reagibilität der Fibroblasten auf bekannte, migrationsfördernde Stimuli zu überprüfen, wurde zuerst die Reaktivität der nichttransduzierten, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten auf h-PDGF-BB getestet. Dabei ergab sich in nichttransduzierten Fibroblasten eine Migrationssteigerung durch hPDGF-BB, wie in den Vorexperimenten beschrieben, hier auf $166\pm 18\%$ (n=3, p<0,05) gegenüber der Kontrolle. Der, aus verschiedenen Arbeiten [33] [95] [99] bekannte, chemotaktische Effekt von PDGF auf Fibroblasten wurde hier bestätigt. Die Zugabe von hPDGF-BB nur in die obere Kammer bzw. in beide Kammern erzeugte kein Konzentrationsgefälle, gegen das die Fibroblasten migrieren konnten und verringerte den Anteil der migrierten Zellen auf $32\pm 8\%$ (n=3, p<0,01) bzw. $49\pm 10\%$ (n=3, p<0,01) der Kontrolle (siehe Abbildung 15a).

In Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten zeigten sich im Prinzip die gleichen Ergebnisse - Steigerung der gerichteten Migration durch hPDGF-BB auf $184\pm 31\%$ (n=8, p<0,05) und Hemmung der ungerichteten, chemokinetischen Bewegung der Zellen auf $49\pm 16\%$ (n=8, p<0,01) bei Stimulation in der oberen Kammer. Bei Stimulation in beiden Kammern betrug der Anteil der in der Membran befindlichen Zellen $112\pm 29\%$ (n=8, n.s.) verglichen mit der Kontrolle. Damit schien das Ansprechen der Ad5AT2-transduzierten Zellen auf die hPDGF-BB-Stimulation gegenüber nichttransduzierten porcinen kardialen Fibroblasten nicht wesentlich modifiziert zu sein (siehe Abbildung 15b).

In Ad5TA2-transduzierten Zellen ergab sich der gleiche Trend – Steigerung der gerichteten Migration auf $406\pm 113\%$ (n=7, p<0,05) und Hemmung der ungerichteten Zellbewegung $68\pm 19\%$ (n=7, n.s.) bzw. $89\pm 18\%$ (n=7, n.s.) der Kontrolle. Allerdings war der Migrationseffekt durch hPDGF-BB gegenüber der Migrationssteigerung bei nichttransduzierten und Ad5AT2-transduzierten porcinen kardialen Fibroblasten verstärkt. Dieser quantitative und nicht qualitative Unterschied könnte auf einer unspezifischen Migrationssteigerung durch die Ad5TA2-Transduktion oder auf einer migrationsfördernden Wirkung einer möglichen Elimination von AT2-Rezeptoren durch das Antisense-Konstrukt, auch in weitgehender Abwesenheit von Ang II, beruhen (siehe Abbildung 15c).

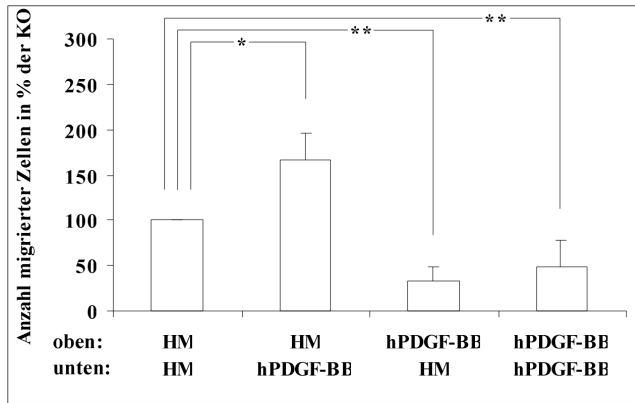


Abbildung 15a: Migration nichttransduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit hPDGF-BB

n=3

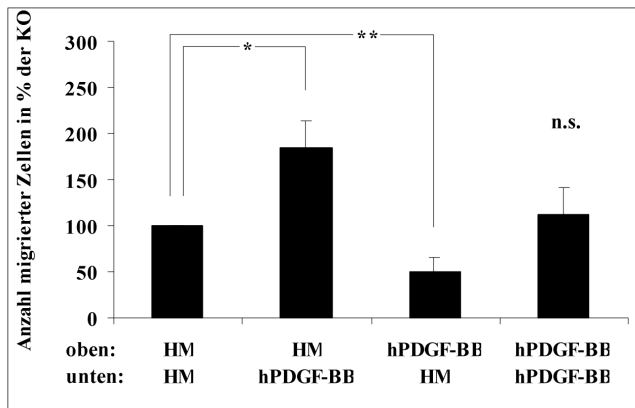


Abbildung 15b: Migration Ad5AT2-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit hPDGF-BB

n=8

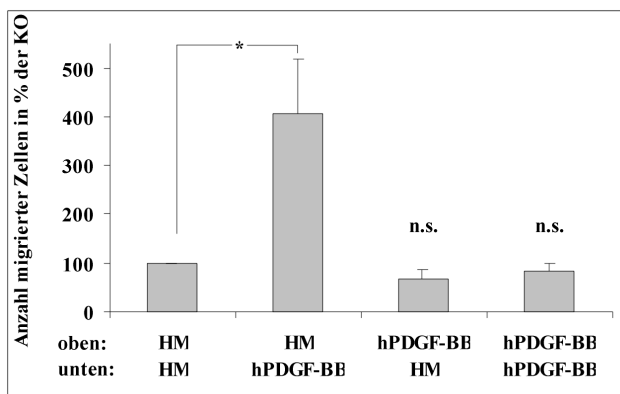


Abbildung 15c: Migration Ad5TA2-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit hPDGF-BB

n=7

HM:	Hungermedium (DMEM, inkl. 0,4% fetales Kälberserum)
hPDGF-BB:	„Human platelet derived growth factor BB-Homodimer“
KO:	Kontrolle (oben HM, unten HM)
n.s.:	Nicht signifikant gegenüber Kontrolle
*:	$p < 0,05$
**:	$p < 0,01$

Insgesamt übte hPDGF-BB in nichttransduzierten, Ad5AT2- und in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Zellen migrationsfördernde Effekte aus. Dabei war die hPDGF-BB-vermittelte Migration in Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten gegenüber der Migration in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten signifikant verringert ($184 \pm 31\%$ vs. $406 \pm 113\%$, $n=7-8$, $p < 0,05$).

3.3.3 Migration nichttransduzierter, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Angiotensin II über AT1-Rezeptoren chemotaktisch auf glatte Gefäßmuskelzellen und Fibroblasten wirkt [31] [112]. Die Wirkung einer AT2-vermittelten Ang II-Stimulation auf die Migration wurde bisher noch nicht untersucht. In einer Reihe von zwei bis vier Experimenten wurde daher die Migration von nichttransduzierten Fibroblasten, Ad5AT2- sowie Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten untersucht. Als chemotaktische Substanz wurde Ang II in einer Endkonzentration von $1 \mu\text{M}$ eingesetzt. Ausgewertet wurde die prozentuale Änderung der Migration bei Ang II-Stimulation gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Ziel dieser Experimente war, einen möglichen AT1-antagonistischen Effekt in den AT2-überexprimierenden, Ang II-stimulierten Fibroblasten nachzuweisen. In den nichttransduzierten Fibroblasten erhöhte die Stimulation mit Ang II die Migration gegenüber der Kontrolle signifikant auf einen Wert von $166 \pm 14\%$ ($n=2$, $p=0,040$). Dies war vergleichbar mit der Induktion durch hPDGF-BB. Die Zugabe von Ang II nur in die obere Kammer steigerte die Migration nicht signifikant auf $125 \pm 11\%$ ($n=2$) und bei Stimulation in beiden Kammern stieg die Migration gegenüber der Kontrolle signifikant auf $179 \pm 3\%$ ($n=2$, $p < 0,002$) an. Dies entsprach einer Steigerung der ungerichteten Mobilität der Fibroblasten durch Ang II, also einem chemokinetischen Effekt von Ang II und unterschied sich darin von dem ungerichteten, chemokinetischen, hPDGF-BB-induzierten Effekt. Da kein AT1-Antagonist eingesetzt wurde, könnte dies einem migrationsfördernden Effekt von endogenen AT1-Rezeptoren entsprechen (siehe Abbildung 16a).

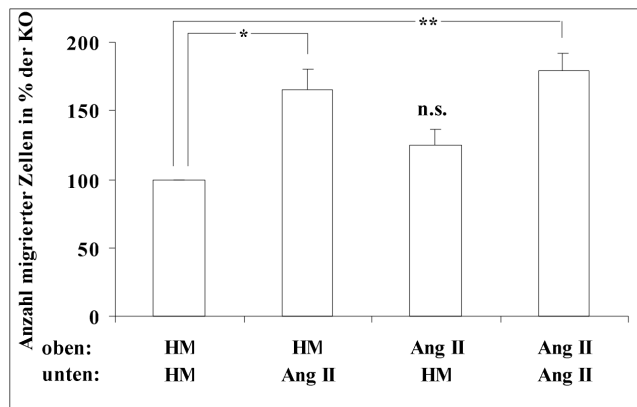


Abbildung 16a: Migration nichttransduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II

n=2

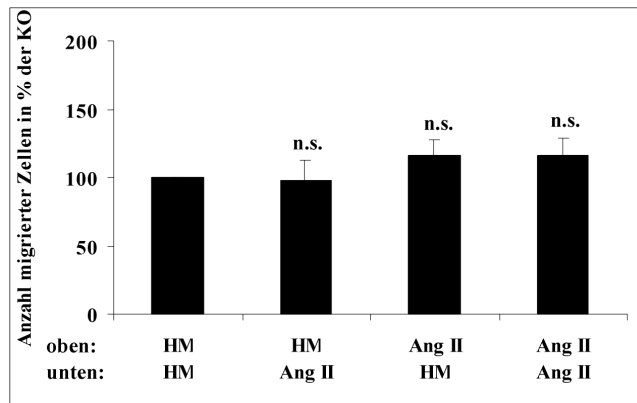


Abbildung 16b: Migration Ad5AT2-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II

n=4

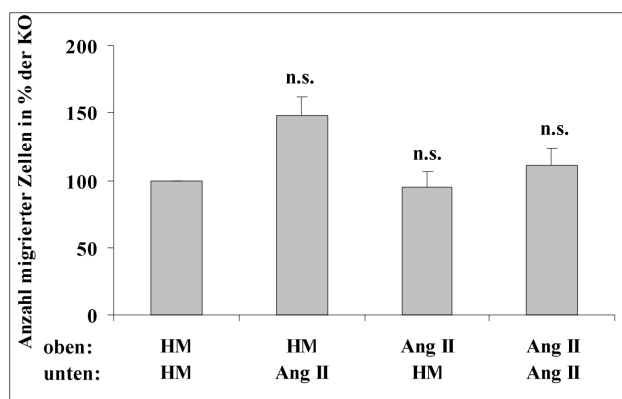


Abbildung 16c: Migration Ad5TA2-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II

n=4

Ang II:	Angiotensin II
HM:	Hungermedium (DMEM, inkl. 0,4% fetales Kälberserum)
KO:	Kontrolle (oben HM, unten HM)
n.s.:	Nicht signifikant gegenüber Kontrolle
*:	$p < 0,05$
**:	$p < 0,01$

In den Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten betrug die relative Migration bei Ang II-Stimulation $98 \pm 15\%$ ($n=4$) und unterschied sich damit nicht signifikant von der unstimulierten Kontrolle. Verglichen mit der Migration in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten, Ang II-stimulierten Fibroblasten war die Migration hier deutlich verringert ($98 \pm 15\%$ vs. $148 \pm 27\%$, $n=4$, $p=0,11$) und gegenüber der nichttransduzierten Kontrolle verringerte Ang II-Stimulation die Migration hier signifikant ($98 \pm 15\%$ vs. $166 \pm 14\%$, $n=2-4$, $p < 0,05$). In dem Ansatz mit Ang II in der oberen Kammer und in dem vierten Ansatz mit Ang II in beiden Kammern konnte keine signifikante Änderung der Migration gegenüber der Kontrolle festgestellt werden (116 ± 12 , $n=4$ bzw. 117 ± 13 , $n=4$). Diese, in Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten festgestellten Ergebnisse, entsprachen tatsächlich der erwarteten Hemmung der Migration durch die Transduktion mit Ad5AT2, damit einem migrationshemmenden, AT1-antagonistischen Effekt von AT2. Allerdings war damit nicht klar, auf welcher Ebene die Hemmung stattfand (siehe Abbildung 16b).

In den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten ergab die Stimulation mit Ang II einen Migrationsanstieg auf $148 \pm 27\%$ ($n=4$) gegenüber der Kontrolle. Dieser Effekt zeigte eine deutliche Tendenz, war jedoch aufgrund der relativ großen Streuung der Meßwerte bei einem p-Wert von 0,088 nicht signifikant. Stimulation mit Ang II in der oberen oder in beiden Kammern erzeugte keine von der Kontrolle signifikant unterschiedliche Migration ($95 \pm 13\%$, $n=4$, bzw. $112 \pm 11\%$, $n=4$). Damit wurde die Hemmung der Migration durch AT2-Rezeptoren, die in den obigen Experimenten beobachtet wurde, durch die Transduktion mit dem Antisense-(Ad5TA2)-Konstrukt tendenziell wieder aufgehoben (siehe Abbildung 16c).

Zusammengefasst: Ang II löste in nichttransduzierten kardialen porcinen Fibroblasten eine signifikante Migrationssteigerung aus, die wahrscheinlich über AT1-Rezeptoren vermittelt wurde. Dieser Effekt war bei AT2-Überexpression und Ang II-Stimulation aufgehoben. Dies zeigte eine antimigratorische Wirkung der Ang II-Stimulation bei AT2-Rezeptorüberexpression in porcinen kardialen Fibroblasten. Bei Antisense-(Ad5TA2)-Expression war der migrationsfördernde Effekt nicht signifikant, aber als deutliche Tendenz erkennbar, so dass diese Zellen sich ähnlich wie die nichttransduzierten Zellen verhielten. Ein unspezifischer, allein durch

den Transduktionsvorgang bedingter Effekt erschien also unwahrscheinlich und so handelte es sich bei den Ergebnissen aus Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten höchstwahrscheinlich um spezifische, AT2-Rezeptorvermittelte Effekte.

3.3.4 Migration nichttransduzierter, Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II und hPDGF-BB

In den vorigen Kapiteln wurden chemotaktische Effekte von Angiotensin II und hPDGF-BB auf die Migration von nichttransduzierten und Ad5AT2- sowie Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten untersucht. Wir fragten nun nach dem Effekt einer Kombination beider Substanzen und untersuchten, welchen Effekt die Kombination von Ang II und hPDGF-BB auf die Migration von nichttransduzierten, sowie Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten ausübte. Bei den nichttransduzierten Fibroblasten war der Migrationsanstieg, der durch jede der Einzelsubstanzen verursacht wurde, in der Kombination unerwarteterweise nicht nachweisbar. Beobachtet wurde eine tendenzielle Steigerung der Migration auf $117 \pm 46\%$ ($n=3$, n.s.) gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Wir konnten bei der geringen Anzahl der Zellen aus einer Charge, der relativ geringen Anzahl der Experimente und dem starken Abweichen eines dieser Werte nicht ausschließen, dass es sich um einen Artefakt handelte. Dies war die wahrscheinlichste Erklärung. Die Stimulation mit Ang II und hPDGF-BB in der oberen bzw. in beiden Kammern reduzierte die Migration nicht signifikant auf $67 \pm 36\%$ ($n=3$) bzw. $74 \pm 18\%$ ($n=3$) gegenüber der Kontrolle (siehe Abbildung 17a).

In den Ad5AT2-transduzierten Zellen führte die Kombination beider Stoffe gegenüber der Kontrolle zu einer signifikanten Migrationssteigerung von $307 \pm 70\%$ ($n=12$, $p<0,01$). Bei Stimulation in der oberen bzw. in beiden Kammern stieg die ungerichtete Migration tendenziell auf $153 \pm 40\%$ ($n=12$, n.s.) bzw. auf $165 \pm 41\%$ ($n=12$, n.s.) gegenüber der nichtstimulierten Kontrolle. Es könnte sich bei der beobachteten Migrationssteigerung um einen allein durch hPDGF-BB vermittelten Effekt handeln, der in den benutzten Zellchargen zufällig stärker ausgeprägt war, als bei den in Kapitel 3.3.2 beschriebenen Experimenten und durch die Anwesenheit von AT2-Rezeptoren, wie dort gezeigt, nicht beeinflusst wurde. Auch könnte es sich um eine AT1-Rezeptor- und PDGF-Rezeptor-vermittelte Migrationssteigerung handeln, die durch die Ad5AT2-Transduktion nicht bzw. nur unvollständig verhindert wurde. Als weitere Möglichkeit konnte eine bisher nicht bekannte Interaktion von hPDGF-BB mit den AT2-

Signaltransduktionswegen in Betracht gezogen werden, die die beobachtete Migrationssteigerung auslöst (siehe Abbildung 17b).

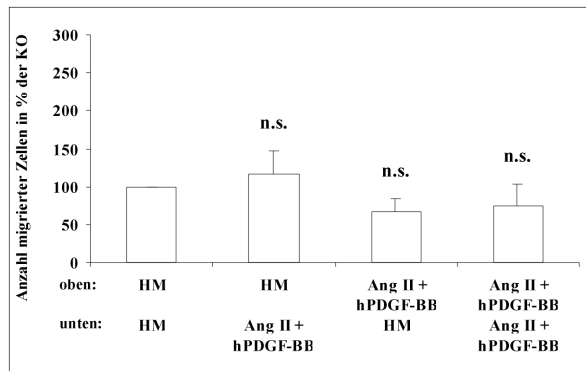


Abbildung 17a: Migration nichttransduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II und hPDGF-BB

n=3

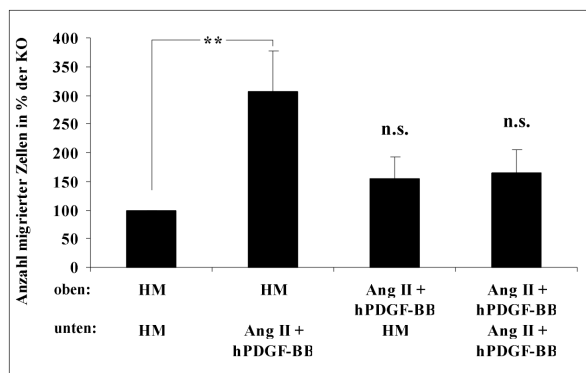


Abbildung 17b: Migration Ad5AT2-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II und hPDGF-BB

n=12

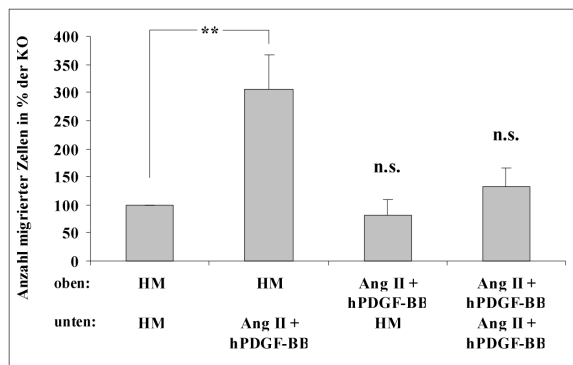


Abbildung 17c: Migration Ad5TA2-transduzierter Fibroblasten bei Stimulation mit Angiotensin II und hPDGF-BB

n=11-12

Ang II:	Angiotensin II
HM:	Hungermedium (DMEM, inkl. 0,4% fetales Kälberserum)
hPDGF-BB:	„Human platelet derived growth factor BB-Homodimer“
KO:	Kontrolle (oben HM, unten HM)
n.s.:	Nicht signifikant gegenüber Kontrolle
*:	p<0,05
**:	p<0,01

In den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten führte die Stimulation mit Ang II und hPDGF-BB, verglichen mit der Kontrolle, ebenfalls zu einer signifikanten Migrationssteigerung. Sie erreichte einen Wert von $305 \pm 61\%$ (n=11, p<0,01). Stimulation nur in der oberen bzw. in beiden Migrationskammern führte zu nicht signifikanten Änderungen der Migration von $83 \pm 28\%$ (n=12) bzw. $132 \pm 33\%$ (n=12) gegenüber der Kontrolle (siehe Abbildung 17c).

Damit unterschied sich bei Stimulation mit Ang II und hPDGF-BB die Migration der Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten deutlich von der Migration nichttransduzierter Fibroblasten, deren Migrationsrate wir für artefaktbedingt zu niedrig halten. Sie stimmte in ihrer hohen Migrationsrate aber gut mit den Ang II-plus-hPDGF-BB-stimulierten Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten überein. Insgesamt waren die Doppelstimulationen schwer zu erklären. Betrachtete man nur die qualitativen Effekte, so stimmen diese mit denen der hPDGF-BB-Stimulation überein. Betrachtet man die Quantität der Effekte, so könnte sich ergeben, dass die Kombination von Ang II und hPDGF-BB andere Effekte als die Stimulation mit den Einzelsubstanzen hatte.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Effekt der Ang II-Stimulation bei adenovirusvermittelter Überexpression des humanen AT2 Rezeptors in primären porcinen kardialen Fibroblasten auf die TGF- β_1 -stimulierte Collagen I α 2-mRNA-Expression und die Migration bei Stimulation mit Ang II bzw. mit Ang II und hPDGF-BB untersucht. Dabei wurde von der Hypothese ausgegangen, dass AT2 möglicherweise die durch den endogenen AT1-Rezeptor vermittelten Effekte antagonisiert.

4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Ad5AT2-transduzierte, Ang II plus TGF- β_1 -stimulierte Fibroblasten zeigten keinen signifikanten Unterschied im Collagen I α 2-mRNA/ β -Actin-mRNA-Quotienten im Vergleich zur nichtstimulierten Kontrolle sowie im Vergleich zu Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten porcinen kardialen Fibroblasten. Das heißt, dass die Anwesenheit und Stimulation des AT2-Rezeptors keinen signifikanten Effekt auf die Collagen I α 2-mRNA-Expression hatte. Es zeigte sich jedoch ein geringer, nicht signifikanter, negativ-regulatorischer Effekt der AT2-Überexpression und TGF- β_1 -Stimulation (d.h. ohne Ang II-Stimulation), so dass in den AT2-exprimierenden Zellen der erwartete Collagen-induzierende Effekt der TGF- β_1 -Stimulation völlig aufgehoben war, während er im Vergleich dazu in den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Zellen immerhin (nicht signifikante) 21,0% betrug (siehe Kapitel 3.2.3).

In den Migrationsexperimenten konnte bei Stimulation mit hPDGF-BB eine gesteigerte Migration in nichttransduzierten ($166 \pm 18\%$, $n=3$, $p<0,05$), Ad5AT2- ($184 \pm 31\%$, $n=8$, $p<0,05$) und in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten ($406 \pm 113\%$, $n=7$, $p<0,05$) nachgewiesen werden. In AT2-überexprimierenden Fibroblasten war die durch alleinige hPDGF-BB-Stimulation ausgelöste Migration jedoch signifikant geringer als in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten. Damit war die in AT2-exprimierenden Fibroblasten beobachtete, gegenüber den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten verringert ausgeprägte, Migrationssteigerung abhängig von der AT2-Expression, auch ohne dass eine spezifische AT2-Stimulation durch Ang II vorgenommen wurde (siehe Kapitel 3.3.2).

Bei Stimulation mit Ang II konnte in nichttransduzierten Fibroblasten eine Steigerung der Migration auf $166 \pm 14\%$ ($n=2$, $p=0,040$) und in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten eine tendenzielle Migrationssteigerung auf $148 \pm 27\%$ ($n=4$, n.s.) gegenüber den jeweiligen

Kontrollen festgestellt werden. Demgegenüber bewirkte Ang II in AT2-überexprimierenden Fibroblasten keinen migrationsfördernden Effekt. Die Migration war hier mit einem prozentualen Anteil von $98 \pm 15\%$ ($n=4$, n.s.) leicht verringert gegenüber der Kontrolle (siehe Kapitel 3.3.3). Damit bewirkte die Ang II-Stimulation von AT2-Rezeptoren eine signifikant geringere Migration gegenüber nichttransduzierten Fibroblasten bzw. eine tendenzielle Migrationshemmung gegenüber Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten porcinen kardialen Fibroblasten.

4.2 Interpretation der Ergebnisse und Vergleich mit der Literatur

4.2.1 Semiquantitative Bestimmung der Collagen I α 2-mRNA

Als Methoden zur Quantifizierung von spezifischen mRNAs standen die Northern Blot-Analyse, der RNase Protection Assay und die RT-PCR zur Verfügung. Die RT-PCR bot die Vorteile einer nichtradioaktiven Methode mit einer hohen Sensitivität [68]. Sie war zum spezifischen Nachweis kleinster Mengen RNA geeignet [52].

In der PCR nahm die Konzentration der gebildeten Amplifikate in der Anfangsphase der PCR kontinuierlich zu. Bei höheren Zyklenzahlen wurde die Amplifikationsrate zunehmend geringer und die Kurve ging in eine Plateauphase über. Das lag zum einen daran, dass dann die in höherer Konzentration vorliegende Produkt-DNA in verstärktem Maße mit sich selbst rehybridisieren konnte und damit in Konkurrenz zu den Primern trat. Weiterhin war die Konzentration der Taq-Polymerase bei hoher Zyklenzahl limitierend, da die Menge an Matritzen-DNA die der Taq-Polymerase überstieg [68]. Die PCR musste so durchgeführt werden, dass bei der gewählten Zyklusanzahl die Konzentration der PCR-Produkte im ansteigenden Bereich lag und die Plateauphase nicht erreicht wurde.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Primer für das Collagen I α 2- und β -Actin-Gen so gewählt, dass die zu erwartenden Reaktionsprodukte mit Längen von 120 bp bzw. 245 bp relativ kurz waren und von daher eine effiziente Amplifikation zu erwarten war. Die Effizienz der Reaktion war außer von der Länge der PCR-Produkte auch abhängig von der Menge an Ausgangsmaterial, Ionenkonzentrationen und der Sequenz der Matrizen-DNA [68]. Aufgrund des überdurchschnittlich hohen Guanin-Cytosinnukleotid-Gehalts der Collagen I α 2-mRNA und der β -Actin-mRNA (beide verfügten über einen Guanin-Cytosinnukleotid-Anteil von ca. 55%) war die PCR-Effizienz bei diesen Genen etwas niedriger als bei anderen (z.B. der Angiotensinrezeptoren), wie in vergleichenden RT-PCRs in unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen wurde. Die Zyklusprofile (Kapitel 3.2.1 und 3.2.2) zeigten, dass bei den verwendeten

Zyklusanzahlen die Plateauphase nicht erreicht war und die Effizienzen der Collagen I α 2- und β -Actin-PCR vergleichbar waren. Damit konnten die Ergebnisse der PCR für eine semiquantitative Bestimmung eingesetzt werden.

Das Bild der Agarosegelelektrophorese wurde digital gespeichert und konnte im Phosphoimager densitometrisch ausgewertet werden. Der Vergleich zwischen densitometrischer Auswertung und Auswertung mittels HPLC zeigte übereinstimmende Ergebnisse (siehe Kapitel 3.2.1), so dass die Agarosegelelektrophorese mit densitometrischer Quantifizierung eine geeignete Methode zur semiquantitativen Bestimmung der RT-PCR-Produkte darstellte. Zur externen Standardisierung der RT-PCR wurde wie in Arbeiten von Kakinuma et al. [48] und Kinoshita et al. [54] das β -Actin, ein Strukturgen, gewählt. Fehler, die in einem Ansatz durch unterschiedlich hohe RNA-Konzentrationen in den Proben oder durch unterschiedlich effiziente RT entstanden, wirkten sich auf die PCR beider Gene in gleichem Maße aus und verfälschten das Ergebnis nicht. Durch die Normalisierung der Collagen I α 2-RT-PCR-Daten anhand der β -Actin-mRNA-Expression war es möglich, die Messwerte aus den verschiedenen Zellkulturen, Stimulationen und Aufarbeitungen zu vergleichen. Die hier benutzte semiquantitative Methode war nicht geeignet zur absoluten Quantifizierung der Collagen I α 2-mRNA-Kopien in der untersuchten Probe. Sie wies aber relative Änderungen der Collagen I α 2-mRNA im Verhältnis zur β -Actin-mRNA nach und war geeignet, Regulation der Collagen I α 2-mRNA-Konzentrationen nachzuweisen. Wie beim Northern Blot und beim RNase Protection Assay wurden bei der RT-PCR die „RNA steady state level“ (RNA-Fließgleichgewichte) bestimmt, die auf der einen Seite durch die Transkriptionsrate und auf der anderen Seite durch die mRNA-Degradationsrate reguliert wurden, d.h. eine Erhöhung der Transkriptionsrate und/oder eine Erniedrigung der Degradationsrate konnte zu einem Anstieg der mRNA-Expression führen. Zur Untersuchung der Funktion des AT2-Rezeptors auf den Collagengehalt im Myokard wurde hier der Collagen I α 2-mRNA-Gehalt als ein möglicher Faktor in der Regulation der Collagensynthese untersucht.

Mögliche Regulation des endogenen AT1-Rezeptors durch den überexprimierten AT2-Rezeptor:

Der Vergleich der Bindungsstudien von nichttransduzierten und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten zeigte, dass die Expression von AT1-Rezeptoren durch den Transduktionsvorgang nicht beeinflusst wurde. Die Bindungsstudien gaben keinerlei Hinweis auf eine Regulation der AT1-Expression durch die AT2-Überexpression, wie es von Tanaka et al. postuliert wurde [102]. Dies wurde jedoch nicht systematisch untersucht, da es nicht Gegenstand der vorliegenden Arbeit war. Da die Zellen nach der Transduktion für 24 h in

serumreduziertem Medium (2% FKS) und von da bis zum Migrationsexperiment bzw. bis zur Stimulation für die Messung der Collagenexpression in Hungermedium (0,4% FKS) gehalten wurden, erfolgte auch keine Stimulation der überexprimierten AT2-Rezeptoren, so dass sie eigentlich keinen Effekt auf die AT1-Expression haben konnten. Dagegen hatte der Serumentzug einen entgegengesetzten Effekt auf die Expression des Transgens AT2 und des endogenen AT1-Rezeptors: Während er die AT2-Expression um ca. 30% reduzierte (nicht gezeigt), da diese unter Kontrolle des serumaktivierbaren CMV-Promotors stand, steigerte er die Expression des endogenen AT1-Rezeptors (letzteres wurde durch eine verringerte Destabilisierung der AT1-mRNA beim Entzug von Wachstumsfaktoren bewirkt [108]).

„Cross linking“-Experimente mit radioaktiv markiertem Ang II gefolgt von einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese-(SDS-PAGE) aus der Arbeitsgruppe zeigten, dass der überexprimierte AT2-Rezeptor dasselbe apparente Molekulargewicht hatte wie der AT2-Rezeptor in Ratten PC12W-Zellen. Dies betrug etwa 55 bis 60 kDa, was darauf hinwies, dass auch der humane AT2-Rezeptor glykosyliert war wie der Ratten-AT2-Rezeptor (unglykolysierter AT2-Rezeptor: ca. 33 kDa bis 40 kDa). Diese Experimente zeigten, dass die AT2-Rezeptoren nicht trunkiert exprimiert wurden.

Aus den Ergebnissen der Experimente zur vorliegenden Arbeit ergab sich:

- I) Durch die Stimulation AT2-überexprimierender und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierter Fibroblasten mit TGF- β_1 allein konnte kein erhöhter bzw. bei Antisense-(Ad5TA2)-Transduktion ein nicht signifikant erhöhter Collagen I α 2-mRNA-Gehalt festgestellt werden. AT2-Überexpression und Stimulation hatten keinen direkten, negativ-regulatorischen Effekt auf den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt.
- II) Eine mögliche inhibitorische Wirkung der AT2-Rezeptor-vermittelten Ang II-Wirkung auf den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, da diese eventuell nur bei einer gesteigerten Collagen I α 2-mRNA-Expression wirkt.
- III) Möglicherweise kann der in den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten festgestellte, tendenzielle Anstieg des Collagen I α 2-mRNA-Gehalts (von 21,0%, n.s.) bei alleiniger TGF- β_1 -Stimulation gegenüber AT2-exprimierenden Fibroblasten in weiteren Experimenten in signifikantem Maß bestätigt werden. Das würde für eine inhibitorische Wirkung der AT2-Rezeptoren ohne Ang II-Stimulation auf die Collagen I α 2-mRNA-Expression sprechen.

IV) In den Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten hatte die Stimulation mit Ang II zusätzlich zur TGF- β_1 -Stimulation und im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Einfluss auf den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt der Fibroblasten. In den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten änderte Ang II in Kombination mit TGF- β_1 den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt gegenüber der Kontrolle nicht und führte im Vergleich zu alleiniger TGF- β_1 -Stimulation zu einer nicht signifikanten Verringerung des Collagen I α 2-mRNA-Gehalts um 19,1%. Auch in den von Kupfahl et al. [57] beschriebenen Experimenten mit humanen kardialen Fibroblasten konnte durch Ang II kein direkter Anstieg der Collagen I-mRNA nachgewiesen werden. Ein negativ-regulatorischer Effekt des Ang II-stimulierten AT2-Rezeptors auf den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt der Zelle konnte in der vorliegenden Arbeit nicht nachgewiesen werden. Es zeigte sich aber ein tendenziell verringerter Collagen I α 2-mRNA-Gehalt in nicht Ang II-stimulierten AT2-exprimierenden Fibroblasten. Dabei war zu berücksichtigen:

1.) Speziesspezifische Unterschiede: Zwischen Rattenfibroblasten und humanen kardialen Fibroblasten wurden (z.B. in der Osteopontinexpression) speziesspezifische Unterschiede beschrieben [51] und traten möglicherweise auch im Verhalten der Zellen gegenüber Wachstumsfaktoren auf. Möglicherweise spielten Speziesunterschiede auch eine Rolle bei den nur sehr geringen Reaktionen der porcinen Fibroblasten auf TGF- β_1 (evtl. durch speziesspezifische Unterschiede in der Expression von TGF- β_1 -Rezeptoren). Weiterhin degenerierten humane Fibroblasten wesentlich schneller als porcine Fibroblasten, was an der Abrundung der Zellen und an der AT1-Herabregulation erkennbar wurde [51] [57]. Die humanen Fibroblasten reagierten, verglichen mit den porcinen Zellen, also stärker auf die Einflüsse der Kultivierung und ein unterschiedliches Verhalten konnte auch bei spezifischen Signalen erwartet werden. Verursacht wurde die unterschiedlich schnelle Degeneration der Zellen möglicherweise dadurch, dass die menschlichen Fibroblasten in der Regel aus älteren Individuen stammten und viele Zellteilungszyklen durchlaufen hatten.

2.) Zellkulturbedingte Effekte: TGF- β_1 war in der latenten Form in hohen Konzentration im fetalen Kälberserum vorhanden. Dadurch konnten während der Kultivierung der Fibroblasten die TGF- β -Rezeptoren in der Zellkultur herabreguliert sein. Im Experiment führte dies zu einer verringerten Antwort der Fibroblasten auf TGF- β_1 . Möglicherweise könnte durch eine längere Inkubationsphase der Zellkulturen mit Hungermedium (inkl. 0,4% Fetales Kälberserum) oder durch ein andere Form von Hungermedium eine Herabregulation von TGF- β -Rezeptoren

rückgängig gemacht werden. Durch den Serumentzug in der Phase des Aushungerns der Zellen vor der Durchführung der Experimente wurden AT1-Rezeptoren heraufreguliert und AT2-Rezeptoren um ca. 30% herabreguliert. Dies konnte in den AT2-transduzierten Fibroblasten die Relation der ATR zueinander gegenüber den Bindungsstudien verändern und eine veränderte Collagen I α 2-mRNA-Expression begründen. Jedoch war in den unter diesen Bedingungen durchgeführten Bindungsstudien das AT2/AT1-Verhältnis mindestens 6:1, so dass auch nach dem Aushungern noch eine höhere AT2- als AT1-Expression vorhanden war.

3.) Transduktionsbedingte Reaktionen: Die Transduktion mit einem adenoviralen Vektor konnte sich wie eine adenovirale Infektion auf die Wirtszellen auswirken und zur Geninduktion von Zytokinen führen. Newman et al. beschrieben in einem in vivo Modell für adenoviralen Gentransfer eine Entzündungsreaktion und Neointimaproliferation [75]. Hintergrundeffekte durch Reaktion der Fibroblasten auf die adenovirale Infektion konnten so aufgetreten sein und spezifische, durch TGF- β ₁ bzw. Ang II ausgelöste Effekte überdeckt haben. Aus diesem Grund wurden viral transduzierte Zellen auch mit viral-transduzierten Zellen (einem Kontrollgen, z.B. der Galaktosidase, bzw. hier einem „Antisense“-Konstrukt) verglichen. Nach Gerszten et al. konnte auch die m.o.i. einen Einfluss auf unspezifische Effekte haben [30]. So sollte die m.o.i. im Hinblick auf das spezifische Genprodukt und im Hinblick auf mögliche unspezifische Wirkungen ausgewählt werden. In Experimenten mit adenoviralem Gentransfer in Mäusen, in einem in vivo Modell also, konnte ein z.T. erheblicher Anstieg von mRNA verschiedener Zytokine festgestellt werden. Dieses grundsätzliche Problem beim Einsatz adenoviraler Vektoren zeigte sich vor allem in der Gentherapie bzw. in Tiermodellen. Die Expression adenoviraler Proteine führte zu einer Immunantwort des Wirts, was zu einer Eliminierung der infizierten Zellen und damit zum Verlust des Transgens führte. Bei hoher m.o.i. verursachten alle adenoviralen Vektoren Nekrose und Apoptose [71]. In Zellkulturen konnte die Infektion mit adenoviralen Vektoren möglicherweise zu einer Chemokin- bzw. Zytokinexpression führen und evtl. die Proliferation der Zellen beeinflussen. Bei der Infektion von Zellkulturen trat spätestens ab einer m.o.i. von 100 ein Sättigungseffekt auf, d.h. eine höhere m.o.i. führt nicht mehr zu einer weiteren Steigerung der Transgenexpression. Das lag wahrscheinlich an der begrenzten Zahl der Cocksackie-Adenovirus-Rezeptoren (CAR) bzw. der Integrine auf der Zelloberfläche. In der vorliegenden Arbeit konnte keine Verringerung der Viabilität und Proliferationsrate der transduzierten Zellen gegenüber nichttransduzierten festgestellt werden. Vermeidbar könnten unspezifische Effekte adenoviraler Vektoren in vivo in der Zukunft möglicherweise durch den

Einsatz neuerer adenoviraler Vektoren mit der Deletion anderer viraler Funktionseinheiten, zusätzlich zur E1-Transkriptionseinheit, sein [26].

4.) Fehlende Interaktion der Fibroblasten mit anderen Zelltypen in der Zellkultur: Von klinischer Relevanz war die Fibroblastenaktivierung und Collagenakkumulation bei kardialer Dysfunktion [11]. Außer dem hier untersuchten Collagen I α 2-mRNA-Gehalt konnten eine Vielzahl von Faktoren den Collagengehalt im Myokard beeinflussen. Die Fibroblasten standen aber in der vorliegenden Arbeit, anders als im Myokard, nicht unter dem Einfluss von auto- bzw. parakrinen Faktoren aus dem umgebenden Gewebe und wurden so in Bezug auf die Collagensynthese nicht beeinflusst. Die Interaktion von Kardiomyozyten und Fibroblasten durch parakrine Effekte war bei der Entstehung der Hypertrophie von großer Bedeutung. So sezernierten Fibroblasten Faktoren, die die Hypertrophie von Myozyten bewirkten. Myozyten konnten als Sensor für Hypoxie dienen und Signale an Blutgefäße und möglicherweise auch an Fibroblasten in Form von parakrinen Faktoren abgeben. Die Wirkung von Ang II und anderen Faktoren auf Fibroblasten konnte durch Interaktion mit mechanischer Belastung der Zellen verstärkt werden. Diese Interaktionen mussten bei der Bewertung der Hypertrophie bedacht werden, konnten jedoch in Zellkulturen, wie in der vorliegenden Arbeit benutzt, nicht untersucht werden.

5.) Einfluss von Fibroblastenproliferation, posttranslationaler Regulation und Matrix Metalloproteinasen (MMP): Auch konnte in vivo eine erhöhte Fibroblastenproliferation bei gleicher Collagensynthese pro Zelle zur Fibrose geführt haben, ohne dass der Collagen I α 2-mRNA-Gehalt erhöht wurde. Eine Proliferationssteigerung konnte aber in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht werden. Die Collagensynthese wurde sowohl translational, wie auch posttranslational reguliert [59]. Posttranslationale Regulationen konnten den Collagengehalt steigern, ohne dass Änderungen im Gehalt der Collagen-mRNA erkennbar sein mussten. Zum Beispiel konnte der Collagengehalt in der Zelle auch durch Collagendegradation beeinflusst werden und so konnte der Collagengehalt durch MMPs verringert werden, ohne dass dies am Collagen-mRNA-Gehalt erkennbar war. Eine Ursache für eine Aktivierung von MMPs konnten inflammatorische Zytokine sein. So stellten Siwik et al. in kardialen Rattenfibroblasten fest, dass Zytokine den Gehalt an mRNA wichtiger Procollagene verringerten und die MMP-Aktivität erhöhten. Dabei war allerdings fraglich, ob in der Zellkultur noch einige Tage nach der adenoviralen Infektion erhöhte Zytokinspiegel vorhanden waren. Möglicherweise wurde dabei der MMP-Aktivitätsanstieg teilweise durch Verringerung der TIMP- („tissue inhibitor of metalloproteinase“-)-Expression hervorgerufen [98]. Interessant war dieses Erkenntnis in Zusammenhang mit dem o.g. adenoviral bedingten Zytokinanstieg. Außer Ang II spielten

Aldosteron und Endotheline eine zentrale Rolle im „Remodeling“ der extrazellulären Matrix [7]. Auch Peptide wie TGF- β_1 und PDGF sowie mechanische Dehnung erhöhten den Collagengehalt auf transkriptioneller Ebene [7].

4.2.2 Migration der porcinen kardialen Fibroblasten

Der Vergleich mit bisher veröffentlichten Daten zeigte, dass Collagen zur Beschichtung der Migrationsmembran geeignet war, eine Adhäsion und nachfolgende Migration von Fibroblasten zu ermöglichen [99]. Während in der Arbeit von Seppä et al. in humanen, fetalen Hautfibroblasten eine maximale chemotaktische Antwort bei einer PDGF-Konzentration von ca. 1 U/ml (ca. 3000 ng/ml) beschrieben wurde [95], ist von Soma et al. und anderen PDGF in Migrationsexperimenten mit Fibroblasten PDGF in Konzentrationen von 20 ng/ml erfolgreich eingesetzt worden [33] [99]. Die Ang II-Konzentrationen wurde korrekt gewählt, wie Vergleiche mit anderen Arbeiten zeigten [31] [40]. Meist löste Ang II auch in Konzentrationen von 100 nM bis 10 nM oder darunter Effekte aus [89]. Die Anzahl der Passagen und die damit verbundenen Änderungen der Zelleigenschaften musste berücksichtigt werden. Bei Bindegewebszellen aus Haut adulter Mäuse (ATC, „adult connective tissue cells“) kam es in der 8. bis 10. Passage zu spontanen Transformationen. Normale ATC zeigen eine positive chemotaktische Antwort auf PDGF, wohingegen die transformierten ATC über eine verringerte Fähigkeit verfügten, gegen PDGF zu migrieren [33]. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Fibroblasten stammten aus der 4. bis 6. Passage und lagen damit im Rahmen vergleichbarer Untersuchungen [15] [29] [31]. Trotzdem musste eine mögliche Veränderung der Zellmorphologie durch die Zellkultur als mögliche Ursache unerwarteter Ergebnisse in Betracht gezogen werden. Dies könnte in zukünftigen Experimenten durch den Einsatz früherer Passagen überprüft werden. Chemotaxis war abhängig von der Zelldichte [99]. Zellen, die durch hohe Zelldichte wachstumsinhibiert waren, zeigten eine 25-fach höhere Migrationsrate als exponentiell wachsende Zellen [33]. In den zur vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimenten wurde Wachstumsinhibition durch eine 24-stündige Inkubation der Zellkulturen in Hungermedium mit einem FKS-Gehalt von 0,4% erreicht. Dies sollte vor allem die Wirkung von Serumfaktoren auf die Migration reduzieren. Bei der Auswertung von Migrationsexperimenten mit der modifizierten Boyden-Kammer musste berücksichtigt werden, dass bei jeder Migrationskammer nur ein Teil der Porenmembran ausgewertet werden konnte. Es wurde daher die Anzahl der ausgezählten Gesichtsfelder gegenüber vergleichbaren Arbeiten auf acht erhöht und es gingen nur solche

Migrationsexperimente in die Auswertung ein, in denen die Fibroblasten homogen auf der Porenmembran verteilt waren.

Die für die vorliegende Arbeit durchgeführten Vorexperimente (Kapitel 3.3.1) und Experimente (Kapitel 3.3.2) ergaben, dass eine signifikante hPDGF-BB-vermittelte Steigerung der Migration in unbehandelten Fibroblasten und in transduzierten Fibroblasten erreicht werden konnte. Diese Migrationssteigerungen waren im Vergleich zu den in der Literatur beschriebenen Daten als gering einzustufen. Die Ursache konnte darin liegen, dass das verwendete humane PDGF-BB nicht vollständig kompatibel war mit den PDGF-Rezeptoren der porcinen Zellen. Die durch die alleinige Stimulation mit hPDGF-BB induzierte Migration der AT2-überexprimierenden Fibroblasten war gegenüber der Migration in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Kontrollfibroblasten signifikant verringert. Möglicherweise führte die hPDGF-BB-Stimulation der Fibroblasten zu einer endogenen Ang II-Produktion und damit zu einer AT2-vermittelten Migrationshemmung. Auch war eine intrazelluläre Interaktion des AT2-Signaltransduktionswegs durch Elemente des hPDGF-BB-Signaltransduktionswegs denkbar. So konnten hPDGF-BB-vermittelte Signale bei AT2-Expression auch ohne spezifische AT2-Stimulation zu Migrationshemmung geführt haben.

Die in Kapitel 3.3.3 beschriebenen Experimenten ergaben: Ang II steigerte in nativen Fibroblasten die Migration. Dieser Effekt wurde vermutlich durch AT1-Rezeptoren vermittelt und stimmte mit den bekannten Funktionen von AT1-Rezeptoren überein [112]. In den Antisense-(AdTA2)-transduzierten Fibroblasten zeigte der tendenzielle Anstieg der Migration, dass möglicherweise durch den Transduktionsvorgang und damit verbundene unspezifische Effekte die Migration geringfügig beeinflusst wurde. In Fibroblasten mit AT2-Rezeptorexpression war, verglichen mit nichttransduzierten Fibroblasten und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Kontrollen, der promigratorische Effekt vollständig aufgehoben. Dies bestätigte die vermutete migrationshemmende, AT1-antagonistische Wirkung der AT2-Rezeptor-Stimulation. Dieser Befund stimmte überein mit beschriebenen AT1-antagonistischen Wirkungen bei Zellwachstum und Vasokonstriktion [45]. Über die Stärke der von Ang II induzierten, chemotaktischen Wirkung lagen außer den Veröffentlichungen von Graf et. al. [31] wenig Informationen vor. Von anderen Arbeitsgruppen wurde jedoch die chemotaktische Wirkung von Ang II in bovinen Perizyten untersucht und mit einer Migrationssteigerung von ca. 55% angegeben [72]. Dies entsprach den in der vorliegenden Arbeit festgestellten Ergebnissen.

In den weiteren Experimenten (siehe Kapitel 3.3.4) wurde die Wirkung von Ang II und hPDGF-BB auf die Chemotaxis untersucht. Die starke chemotaktische Wirkung von PDGF auf humane

Hautfibroblasten bzw. NIH/3T3-Zellen war bekannt [33] [95] [99]. Die in Kapitel 3.3.4 beschriebene Stimulation der AT2-exprimierenden Fibroblasten mit hPDGF-BB und Ang II erhöhte die Migration stark gegenüber der Migration von nichttransduzierten porcinen kardialen Fibroblasten, die wir für artefaktbedingt (relativ geringe Anzahl der Experimente und starkes Abweichen eines dieser Werte) zu niedrig halten. Gegenüber der Antisense-(Ad5TA2)-Kontrolle blieb die Migration AT2-exprimierender porciner kardialer Fibroblasten bei Stimulation mit Ang II und hPDGF-BB nahezu unverändert. So konnte die in Kapitel 3.3.3. beschriebene migrationshemmende, AT2-vermittelte Ang II-Wirkung bei der Kombination von Ang II und hPDGF-BB hier nicht bestätigt werden. Möglicherweise wurde das exogen zugeführte Ang II rasch inaktiviert und konnte seine Wirkung nicht vollständig vermitteln. Sehr wahrscheinlich waren auch intrazelluläre Interaktionen zwischen endogenen AT1- und PDGF-Rezeptoren sowie den überexprimierten AT2-Rezeptoren beteiligt. Abbildung 18 zeigt ein vereinfachtes Schema der Signaltransduktion mit möglichen Interaktionswegen zwischen AT1-, AT2- und PDGF-Rezeptoren.

Nach Untersuchungen von Horiuchi et al. waren wachstumshemmende Effekte von AT2-Rezeptoren einzigartig insofern, dass diese Rezeptoren mehrere Phosphatasen aktivierten und dadurch in Interaktion („cross talk“) mit den Signalen von anderen sieben-transmembranären, G-Protein-gekoppelten Rezeptoren sowie mit anderen Klassen von Wachstumsfaktorrezeptoren standen. Als mögliche Signaltransduktionswege für eine proliferationshemmende, AT2-vermittelte Ang II-Wirkung wurde von Bedecs et al. die Protein Tyrosin Phosphatase SHP-1 [6], sowie von Horiuchi et al. die Tyrosin Phosphatase MKP-1 genannt [36].

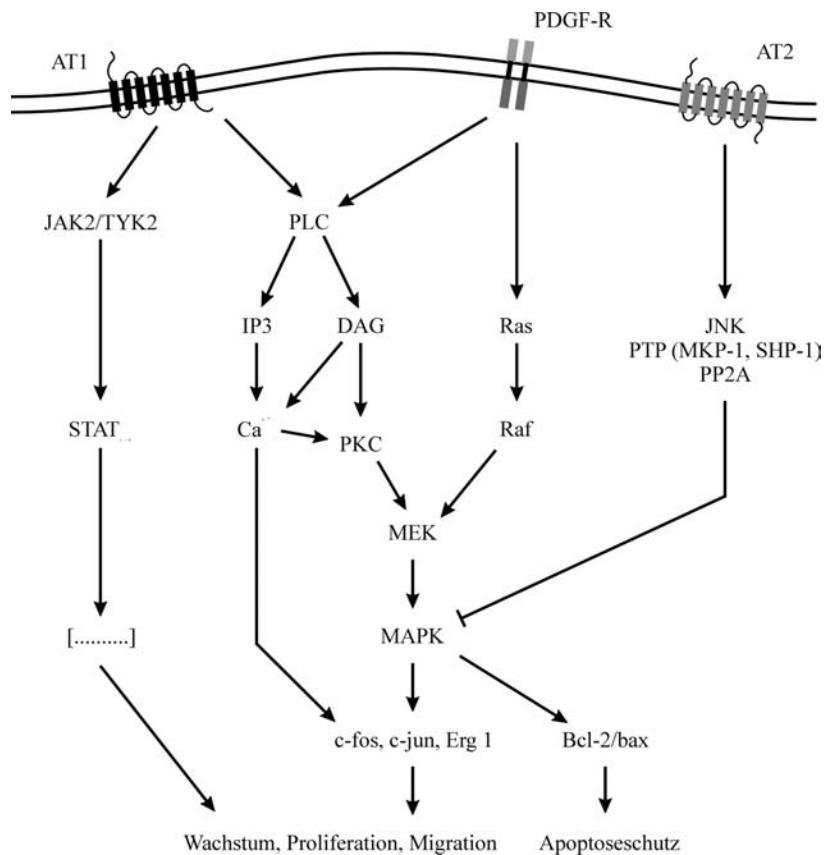


Abbildung 18: Signaltransduktion von AT1-, AT2- und PDGF-Rezeptoren

AT1:	Angiotensin II Rezeptor Typ 1
Bax, Bcl 2:	Antiapoptotisch wirksame Produkte der Protoonkogene bax und bcl 2
Ca ²⁺ :	Kalziumionen
c-fos, c-jun:	Protoonkogene
DAG:	Diacylglycerol
Erg 1:	Produkt des erg 1-Gen
IP3:	Inosit-1,4,5-trisphosphat
JAK2/TYK2:	Januskinase 2/Tyrosinkinase 2
JNK:	c-Jun NH2-terminal kinase
MAPK:	„Mitogen activated protein kinase“, mitogenaktivierte Proteinkinase
MEK:	MAPK-Kinase
MKP-1:	MAPK-Phosphatase
PDGF-R:	„Platelet derived growth factor“-Rezeptor
PKC:	Proteinkinase C
PLC:	Phospholipase C
PP2A:	„Serin/Threonin Phosphatase 2A“
PTP:	Protein-Tyrosin Phosphatasen
Raf, Ras:	Produkte der Protoonkogene raf und ras
SHP-1:	„Src-Homologyregion 2 (SH2) containing tyrosine Phosphatase-1“
STAT:	„Signal transducers and activators of transcription“
→	Aktivierung
—	Hemmung

Weiterhin wurde die durch AT₂-Rezeptoren aktivierte Phosphatase PP2A (Serin/Threonin Phosphatase 2A) als ein möglicher Weg zur Inaktivierung der MAPK aufgeführt (Übersicht in [36]). Welche Phosphatasen durch AT₂-Rezeptoren aktiviert wurden, war noch nicht endgültig geklärt, bzw. schien vom Zelltyp abhängig zu sein. Linseman et al. beschrieben ein Modell für die Interaktionen zwischen G-Protein-gekoppelten ATR (AT₁) und der PDGF-Rezeptor-Tyrosin-Kinase in glatten Gefäßmuskelzellen. Dabei konvergierten die von Ang II vermittelten Signale mit den von PDGF via PDGF- β -Rezeptor-vermittelten Signalen. Stimulation mit Ang II führte zu Phosphorylierung von Shc-Proteinen und zur Komplexbildung mit Wachstumsfaktor-Rezeptor-Bindungsprotein. Einige Aspekte der Signaltransduktion durch AT₁-Stimulation ähnelten denen der PDGF-Stimulation, wie Aktivierung der Tyrosinkinasen, MAPK und der Expression von EGR1 („early growth response genes“) [62].

Schlussfolgerung: Ang II-Stimulation von AT₂-Rezeptor-überexprimierenden porcinen kardialen Fibroblasten wirkte migrationshemmend und bewirkte damit einen AT₁-Rezeptor-antagonistischen Effekt. Der durch alleinige Ang II-Stimulation ausgelöste antimigratorische Effekt war bei Kombination von Ang II mit hPDGF-BB nicht nachweisbar. Interaktionen der Signaltransduktionswege von Angiotensin II- und PDGF-Rezeptoren mussten angenommen werden. Dabei musste die Stimulation mit einer Kombination von Einzelsubstanzen nicht der Summation beider Einzeleffekte entsprechen. Dabei waren folgende Faktoren zu berücksichtigen:

1.) Speziesspezifische Unterschiede: In verschiedenen Arbeiten wurde eine Beteiligung von AT₂-Rezeptoren an der Hemmung von MAPK und der Auslösung von Apoptose in PC12W- und 3T3-Zellen [113] und an der Verringerung von Proliferation in glatten Gefäßmuskelzellen aus Ratten [73] [100] festgestellt. Dabei war zu beachten, dass es sich um Zelllinien (PC12W) bzw. andere Zelltypen (glatte Gefäßmuskelzellen) handelte. Diese stammten, im Gegensatz zu den in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen, aus Ratten. Auch in der Arbeit von Graf et al. [31] wurden kardiale Fibroblasten aus Ratten eingesetzt. Speziesspezifische Unterschiede mussten beim Vergleich der Ergebnisse berücksichtigt werden. In einigen der zitierten Arbeiten wurde der Einfluss von AT₂-Rezeptoren auf Proliferation und Wachstum untersucht. Es war aber fraglich, ob sich die dort festgestellte AT₁-antagonistische Wirkung von AT₂-Rezeptoren auch auf den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt und die Migration übertragen ließ.

2.) Zelltypspezifische Unterschiede: Beim Vergleich der vorliegenden Ergebnisse mit anderen Arbeiten waren mögliche Unterschiede im Fibroblastentyp (Gewebe, aus dem sie isoliert waren) bei der Migration der Fibroblasten zu berücksichtigen. Außer den speziesspezifischen Unterschieden musste auch berücksichtigt werden, dass es sich bei zwei Arbeiten um dermale Fibroblasten [95] [99], im anderen Fall um eine Zelllinie mit fibroblastenähnlichen Eigenschaften (NIH/3T3-Zellen) handelte [33]. Unterschiede dieser Zellen in der Reaktionen auf hPDGF-BB konnten angenommen werden. Wie bei der Untersuchung der Collagen I α 2-mRNA-Expression musste auch bei der Migration das Alter der Zellen und die Passage der Zellkulturen berücksichtigt werden. So wurden bei Graf et al. kardiale Fibroblasten aus neugeborenen Ratten (Tag 1 bis 3 nach der Geburt) gewonnen und in der 2. bis 3. Passage verwendet [31]. Neonatale Fibroblasten verfügten in der Regel über andere Wachstumseigenschaften und eine andere Expression von AT2-Rezeptoren als adulte Tiere [8]. Bei den o.g. humanen Hautfibroblasten handelte es sich um adulte Zellen. So konnte ein anderes Verhalten dieser Fibroblasten im Vergleich zu den in der vorliegenden Arbeit benutzten juvenilen kardialen porcinen Fibroblasten im Hinblick auf die Migration nicht ausgeschlossen werden. Zelltypspezifische Unterschiede in der Reaktion auf Ang II wurden beschrieben in Endothelzellen und Myozyten derselben Tierart und mussten auch hier in Betracht gezogen werden [27].

3.) Funktionelle Koppelung zwischen transduziertem AT2-Rezeptor und zytoplasmatischer Signaltransduktion: Bei dem Gentransfer durch adenovirale Transduktion wurde in der vorliegenden Arbeit das humane AT2-Gen in porcine Zellen übertragen. Dabei war zu beachten, dass die funktionelle Koppelung zwischen ausgebildetem Rezeptor und der Signaltransduktion in der Wirtszelle unterbrochen sein konnte. Dies wurde in der Arbeitsgruppe durch Experimente von Frau Dr. Ch. Warnecke in Übereinstimmung mit Ergebnissen von Mifune et al. [67] ausgeschlossen. Dazu wurde die Protein-Tyrosin-Phosphatase-Aktivität in Ad5AT2- und Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten porcinen Fibroblasten gemessen. Bei ausgehungerten, AT1-antagonisierten und AT2-exprimierenden porcinen Fibroblasten reduzierte Ang II-Stimulation die Protein-Tyrosin-Phosphataseaktivität um ca. 30%. In den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten änderte die Ang II-Stimulation die Protein-Tyrosin-Phosphataseaktivität nicht gegenüber der Kontrolle. Interessanterweise war in den Ad5AT2-transduzierten Fibroblasten in einigen Experimenten bereits die basale, also die nicht Ang II-stimulierte Tyrosin-Phosphataseaktivität durch die AT2-Überexpression verändert. Jedoch hatte der überexprimierte AT2-Rezeptor weder in transduzierten porcinen Fibroblasten, noch in

transduzierten HUVEC und PC12W-Zellen den erwarteten Effekt (Dephosphorylierung) auf die MAP-Kinasen ERK 1 und ERK 2.

4.) Effekte der adenoviralen Transduktion: Prinzipiell waren auch mögliche Änderungen im Zellstoffwechsel durch transduktionsbedingte Effekte in Betracht zu ziehen. Von Grotendorst wurde der direkte Vergleich der Migration von normalen 3T3-Zellen mit verschiedenen virus- und spontantransformierten 3T3-Zellen beschrieben. Die virustransformierten Zelllinien wiesen dabei einen höheren Grad an ungerichteter Migration auf [33]. Möglicherweise hatte die adenovirale Transduktion unspezifische Effekte auf die transduzierten Zellen, so dass spezifische AT2-vermittelte Effekte nicht festgestellt wurden, weil sie durch Effekte der adenoviralen Transduktion überdeckt wurden. Möglicherweise waren die AT2-Rezeptor-vermittelten Effekte auch trotz hoher Überexpression zu schwach, um gegenüber hPDGF-BB-vermittelten Effekten festgestellt zu werden oder die AT2-Rezeptor-vermittelten Effekte traten erst bei langfristiger Stimulation bzw. nur in vivo in Erscheinung. Ein wichtiger Vorteil der Überexpression von AT2-Rezeptoren war aber die Möglichkeit, einen Kontrollvektor als Vergleichswert einsetzen zu können und nicht die AT2-Rezeptorblockade als Kontrolle zu benötigen, da die AT2-Rezeptor-Inhibitoren möglicherweise eigene, unspezifische Effekte auslösen konnten und so eine falsche AT2-Rezeptor-Wirkungen vortäuschen konnten.

Die z.T. unbestätigten Hypothesen der vorliegenden Arbeit und neuere, widersprüchliche Arbeiten [94] zeigen, dass die Funktion und Wirkung der AT2-Rezeptoren weiterhin kontrovers diskutiert wird und definitive Aussagen zum gegenwärtigen Zeitpunkt kaum möglich sind.

4.3 Bedeutung für zukünftige Untersuchungen

Der von Agocha et al. durchgeführte Vergleich von humanen kardialen Fibroblasten- und Kaninchenfibroblastenzellkulturen zeigte, dass in beiden Zellkulturen signifikante Unterschiede im Hinblick auf Zelloberfläche, basaler und induzierter DNA-Synthese sowie basaler und TGF- β_1 -induzierter Collagen I-mRNA bestanden [1]. Gallagher et al. fanden speziesspezifische Unterschiede in der AT1-Expression, dem Anstieg der intrazellulären Kalziumionenkonzentration und der Arachidonsäurefreisetzung [28]. Diese speziesspezifischen Unterschiede mussten auch in Untersuchungen anderer Zellfunktionen berücksichtigt werden. Menschliche kardiale Fibroblasten waren oft nicht in ausreichender Menge vorhanden. Fibroblasten aus Schweineherzen waren einfacher zu erhalten und boten im Vergleich zu Nagetierzellen vermutlich eine größere Homologie zu menschlichen Fibroblasten. Es war

jedenfalls eine viel höhere Nukleinsäure- und Protein- bzw. Aminosäure-Sequenzhomologie zwischen porcinen und humanen Zellen vorhanden als das bei Nagetierzellen und humanen Zellen der Fall war. Sehr wahrscheinlich bedingte diese hohe Homologie auch, dass sich porcine Zellen gegenüber humanen Zellen ähnlicher verhielten als das Nagetierzellen taten. AT2-Rezeptor-mRNA und -Expression konnte in Zellkulturen von adulten kardialen Fibroblasten von Ratte, Schwein und Mensch nicht nachgewiesen werden [57] [74] [81]. Beide Rezeptortypen, AT1 und AT2, wurden aber in myokardialen Geweben von Kaninchen, Ratten und Menschen gefunden [84] [93] [101]. Ein Fehlen von AT2-Rezeptoren in isolierten, adulten kardialen Fibroblasten konnte einen schnellen Verlust von AT2 während der Kultivierung widerspiegeln [18]. Auch nach Dudley et al. war eine Herabregulation von AT2-Rezeptoren in Zellkulturen durch Wachstumsfaktoren ein bekanntes Phänomen [21].

Zur Klärung der Funktion von AT2-Rezeptoren in kardialen Fibroblasten wird die adenovirale Transduktion in der Zukunft, evtl. mit dem Einsatz verbesserter, adenoviraler Vektoren, einen schonenden Gentransfer und ein geeigneteres Modell zur Untersuchung von AT2-vermittelten Einflüssen bieten. So kann dieses Zellkulturmodell in Zukunft helfen, Wirkungen des RAAS genauer zu erforschen. Von Interesse ist dies, weil die Funktion der AT2-Rezeptoren weiterhin kontrovers diskutiert wird. AT2-Rezeptoren vermitteln nach der gegenwärtigen Meinung einiger Autoren antiproliferative Einflüsse und wirken damit AT1-antagonistisch in Bezug auf das Zellwachstum. Senbonmatsu et al. beschrieben aber bei AT2-Deletion eine verringerte Hypertrophie und stellten den AT1-AT2-Antagonismus in Frage [94]. So sind weitere Untersuchungen erforderlich, diesen Widerspruch zu klären und dazu beizutragen, die pathologischen Mechanismen der kardialen Hypertrophie besser zu verstehen. Die Funktion des AT2-Rezeptors ist also weiterhin noch sehr unvollständig verstanden. Neuere Untersuchungen stellen ältere Befunde in Frage und evtl. haben die AT2-Antagonisten ganz eigene Effekte, die nicht mit dem AT2-Rezeptor in Verbindung stehen. Darauf könnten die kontroversen Befunde beruhen.

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der humanen AT2-Rezeptorexpression und -stimulation auf den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt und die Migration von porcinen kardialen Fibroblasten untersucht, um die Frage zu klären, ob AT2-Rezeptoren in kultivierten kardialen Fibroblasten AT1-antagonistische antifibrotische und migrationshemmende Effekte auf den Collagen I α 2-mRNA-Gehalt bzw. die Migration ausüben. Der AT2-Rezeptor war im humanen Myokard der dominierende ATR-Subtyp, wurde in Zellkultur aber schnell herabreguliert. Um die Funktion der AT2-Rezeptoren in der Zellkultur untersuchen zu können, wurde die AT2-cDNA durch adenovirale Transduktion in die Fibroblasten übertragen und so der AT2-Rezeptor überexprimiert. Mittels RT-PCR wurden die relativen Änderungen im Collagen I α 2-mRNA-Gehalt in TGF- β_1 - bzw. TGF- β_1 plus Ang II-stimulierten Fibroblasten im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle bestimmt. Alle Werte wurden auf ein Referenzgen (β -Actin) bezogen. Die AT2-Stimulation änderte den relativen Collagen I α 2-mRNA-Gehalt der Fibroblasten nicht signifikant gegenüber den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten ($0,947 \pm 0,102$ vs. $0,966 \pm 0,111$, $n=3-5$). Die Überexpression von AT2-Rezeptoren bewirkte aber ohne Ang II-Stimulation einen tendenziell verringerten Collagen I α 2-mRNA-Gehalt gegenüber dem Antisense-(Ad5TA2)-Konstrukt ($0,947 \pm 0,044$ vs. $1,157 \pm 0,147$, $n=3$).

In der modifizierten Boyden-Kammer wurde der AT2-vermittelte Effekt von Ang II, hPDGF-BB sowie der Kombination beider Stoffe auf die Migration untersucht. Die alleinige Stimulation von AT2-Rezeptoren mit Ang II verhinderte die Migration gegenüber nichttransduzierten Fibroblasten ($98 \pm 15\%$ vs. $166 \pm 14\%$, $n=2-4$, $p<0,05$) bzw. tendenziell gegenüber Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten ($98 \pm 15\%$ vs. $148 \pm 27\%$, $n=4$, $p=0,11$). In Kombination mit hPDGF-BB änderte Ang II die Migration in AT2-überexprimierenden Fibroblasten nicht gegenüber den Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten ($307 \pm 70\%$ vs. $305 \pm 61\%$, $n=11-12$, n.s.). Bei ausschließlicher Stimulation durch hPDGF-BB wurde aber in AT2-exprimierenden Fibroblasten eine signifikant geringere Migration als in Antisense-(Ad5TA2)-transduzierten Fibroblasten festgestellt ($184 \pm 31\%$ vs. $406 \pm 113\%$, $n=7-8$, $p<0,05$).

Zu berücksichtigen war, dass es sich hierbei um ein in vitro-Modell handelte. Für komplexe Zellfunktionen waren möglicherweise Zell-Zell-Interaktionen, mechanische Belastung oder gleichzeitige Aktivierung mehrerer neurohumoraler Systeme wie Katecholamine, Endothelin und andere von Bedeutung. Die zugrundeliegende Hypothese, dass AT2-Expression und Stimulation den relative Collagen I α 2-mRNA-Gehalt hemmt, konnte in den vorliegenden Experimenten

nicht bestätigt werden. Dies ließ keine inhibitorische AT2-vermittelte Wirkung von Ang II im Bezug auf den TGF- β_1 -induzierten Collagen I α 2-mRNA-Gehalt erkennen. Dagegen führte die Ang II-Stimulation überexprimierter AT2-Rezeptoren zu einer verringerten Migration und vermittelte so einen AT1-antagonistischen Effekt.

Literaturverzeichnis

- 1: Agocha A., Sigel A.V., Eghbali-Webb M.: Characterization of Adult Human Heart Fibroblasts in Culture: A Comparative Study of Growth, Proliferation and Collagen Production in Human and Rabbit Cardiac Fibroblasts and Their Response to Transforming Growth Factor-beta-1, *Cell and Tissue Research*; 1997; 288: S.87-93.
- 2: Allen A.M., Zhou J., Mendelsohn F.A.: Localization and Function of Angiotensin AT1 Receptors, *American Journal of Hypertension*; 2000; 13: S.31S-38S.
- 3: Asano K., Dutcher D.L., Port J.D., Minobe W.A., Tremmel K.D., Roden R.L., Bohlmeier T.J., Bush E.W., Jenkin M.J., Abraham W.T., Raynolds M.V., Zisman L.S., Perryman M.B., Bristow M.R. : Selective Downregulation of the Angiotensin II AT1-Receptor Subtype in Failing Human Ventricular Myocardium, *Circulation*; 1997; 95: S.1993-1200.
- 4: Baker K.M., Booz G.W., Dostal D.E.: Cardiac Actions of Angiotensin II: Role of Intracardiac Renin-Angiotensin System, *Annual Review of Physiology*; 1992; 54: S.227-241.
- 5: Bauer P., Regitz-Zagrosek V., Hofmeister J., Lokies J., Rolfs A., Hildebrandt A.G., Hetzer R., Fleck E.: Reduced Atrial Angiotensin Receptor Type 1 mRNA Content in End-Stage Human Heart Failure: Assessment by a Novel Quantitative PCR-ELISA Technique, *Journal of Molecular Medicine*; 1996; 74: S.447-454.
- 6: Bedecs K., Elbaz N., Sutren M., Masson M., Susini C., Strosberg A.D.: Angiotensin II Type 2 Receptor Mediate Inhibition of Mitogen-Activated Protein Kinase Cascade and Functional Activation of SHP-1 Tyrosine Phosphatase, *Biochemical Journal*; 1997; 325: S.449-454.
- 7: Booz G.W., Baker K.M.: Molecular Signalling Mechanisms Controlling Growth and Function of Cardiac Fibroblasts, *Cardiovascular Research*; 1995; 30: S.537-543.
- 8: Bottari S.P., de Gasparo M., Stecklings U.M., Levens N.R.: Angiotensin II Receptor Subtypes: Characterization, Signalling Mechanisms, and Possible Physiological Implications, *Frontiers in Neuroendocrinology*; 1993; 14(2): S.123-171.
- 9: Brilla C.G., Maisch B., Weber K.T.: Myocardial Collagen Matrix Remodelling in Arterial Hypertension, *European Heart Journal*; 1992; 13(Supplement D): S.24-32.

- 10: Brilla C.G., Murphy R.L.W., Smits J.F.M., Struijker Boudier H.A.J., Tan L.-B.: The Concept of Cardioreparation: Part 1. Pathophysiology of Remodelling, *Journal of Cardiovascular Risk*; 1996; 3: S.281-285.
- 11: Brilla C.G., Rupp H., Funck R., Maisch B.: The Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Myocardial Collagen Matrix Remodelling in Congestive Heart Failure, *European Heart Journal*; 1995; 16 (*Supplement O*): S.107-109.
- 12: Brilla C.G., Zhou G., Matsubara L., Weber K.T.: Collagen Metabolism in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts: Response to Angiotensin II and Aldosterone, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 1994; 26: S.809-820.
- 13: Bumpus F.M., Catt K.J., Chiu A.T., de Gasparo M., Goodfriend T., Husain A., Peach J.M., Taylor Jr. D.G., Timmermans P.B.: Nomenclature for Angiotensin Receptors. A Report of the Nomenclature Committee of the Council for High Blood Pressure Research, *Hypertension*; 1991; 17(5): S.720-721.
- 14: Campbell S.E., Katawa L.C.: Angiotensin II Stimulated Expression of Transforming Growth Factor-beta-1 in Cardiac Fibroblasts and Myofibroblasts, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 1997; 29: S.1947-1958.
- 15: Carver W., Molano I., Reaves T.A., Borg T.K., Terracino L.: Role of the alpha-1-beta-1 Integrin Complex in Collagen Gel Contraction In Vitro by Fibroblasts, *Journal of Cellular Physiology*; 1995; 165: S.425-437.
- 16: Chomczynski P., Sacchi N.: Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate-Phenol-Chloroform Extraction, *Analytical Biochemistry*; 1987; 162: S.156-159.
- 17: Chua C.C., Chua B.H.L., Zhao Z.Y., Krebs C., Diglio C., Perrin E.: Effect of Growth Factors on Collagen Metabolism in Cultured Human Heart Fibroblasts, *Connective Tissue Research*; 1991; 26: S.271-281.
- 18: Crabos M., Roth M., Hahn A.W., Erne P.: Characterization of Angiotensin II Receptors in Cultured Adult Rat Cardiac Fibroblasts, *Journal of Clinical Investigation*; 1994; 93: S.2372-2387.
- 19: De Gasparo M., Siragy H.M.: The AT₂ Receptor: Fact, Fancy, Fantasy, Regulatory Peptides; 1999; 81: S.11-24.

- 20: Demoliou-Mason C.D.: G-Protein-coupled Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells, *Biological Signals and Receptors*; 1998; 7(2): S.90-97.
- 21: Dudley D.T., Summerfelt R.M.: Regulated Expression of Angiotensin II (AT₂) Binding Sites in R3T3 Cells, *Regulatory Peptides*; 1993; 44: S.199-206.
- 22: Dzau V.J.: Circulating Versus Local Renin-Angiotensin System in Cardiovascular Homeostasis, *Circulation*; 1988; 77(*Supplement 1*): S.I4-I13.
- 23: Eghbali M.: Cardiac Fibroblasts: Function, Regulation of Gene Expression, and Phenotypic Modulation, *Basic Research in Cardiology*; 1992; 87(*Supplement 2*): S.198-189.
- 24: Eghbali M., Tomek R., Woods C., Bhambi B.: Cardiac Fibroblasts are Predisposed to Convert into Myocyte Phenotype: Specific Effect of Transforming Growth Factor-beta, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1991; 88: S.795-799.
- 25: Elias J.M., Marigotta M., Caborc D.: Sensitivity and Detection Efficiency of the Peroxidase Antiperoxidase (PAP), Avidin-Biotin Peroxidase Complex (ABC), and Peroxidase-Labeled Avidin-Biotin (LAB) Methods, *American Journal of Clinical Pathology*; 1989; 92(1): S.62-67.
- 26: Engelhardt J.F., Ye X., Doranz B., Wilson J.M.: Ablation of E2A In Recombinant Adenoviruses Improves Transgene Persistence and Decreases Inflammatory Response in Mouse Liver, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1994; 91: S.6196-6200.
- 27: Fischer T.A., Singh K., O'Hara D.S., Kaye D.M., Kelly R.A.: Role of AT₁ and AT₂ Receptors in Regulation of MAPKs and MKP-1 by Ang II in Adult Cardiac Myocytes, *American Journal of Physiology*; 1998; 275: S.H906-H916.
- 28: Gallagher A.M., Bahnson T.D., Yu H., Kim N.N., Printz M.P.: Species Variability in Angiotensin Receptor Expression by Cultured Cardiac Fibroblasts and the Infarcted Heart, *American Journal of Physiology*; 1998; 274: S.H801-H809.
- 29: Gauss-Müller V., Kleinmann H.K., Martin G.R., Schiffmann E.: Role of Attachment Factors and Attractants in Fibroblast Chemotaxis, *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*; 1980; 96: S.1071-1080.

- 30: Gerszten R.E., Lusinskas F.W., Ding H.T., Dichek D.A., Stoolman L.M., Gimbrone Jr. M.A., Rosenzweig A.: Adhesion of Memory Lymphocytes to Vascular Cell Adhesion Molecule-1-transduced Human Vascular Endothelial Cells Under Simulated Physiological Flow Conditions In Vitro, *Circulation Research*; 1996; 79: S.1205-1215.
- 31: Graf K., Neuss M., Stawowy P., Hsueh W.A., Fleck E., Law R.E.: Angiotensin II and alpha-v-beta-3 Integrin Expression in Rat Neonatal Cardiac Fibroblasts, *Hypertension*; 2000; 35: S.978-984.
- 32: Graf K., Xi X.P., Yang D., Fleck E., Hsueh W.A., Law R.E.: Mitogen-activated Protein Kinase Activation Is Involved in Platelet-Derived Growth Factor-directed Migration by Vascular Smooth Muscle Cells, *Hypertension*; 1997; 29(1 Pt 2): S.334-339.
- 33: Grotendorst G.R.: Alteration of the Chemotactic Response of NIH/3T3 Cells to PDGF by Growth Factors, Transformation, and Tumor Promoters, *Cell*; 1984; 36: S.279-285.
- 34: Hafizi S., Wharton J., Morgan K., Allen S.P., Chester A.H., Catravas J.D., Polak J.M., Path F.R.C., Yacoub M.H.: Expression of Functional Angiotensin-Converting Enzyme and AT1 Receptors in Cultured Human Cardiac Fibroblasts, *Circulation*; 1998; 98: S.2553-2559.
- 35: Hein L., Barsh G.S., Pratt R.E., Dzau V.J., Kobilka B.K.: Behavioural and Cardiovascular Effects of Disrupting the Angiotensin II Type-2 Receptor in Mice, *Nature*; 1995; 377(6551): S.744-747.
- 36: Horiuchi M., Akishita M., Dzau V.J.: Recent Progress in Angiotensin II Type 2 Receptor Research in the Cardiovascular System, *Hypertension*; 1999; 33: S.613-621.
- 37: Horiuchi M., Hayashida W., Kambe T., Yamada T., Dzau V.J.: Angiotensin Type 2 Receptor Dephosphorylates Bcl-2 by Activating Mitogen-activated Protein Kinase Phosphatase-1 and Induces Apoptosis, *The Journal of Biological Chemistry*; 1997; 272: S.19022-19026.
- 38: Horiuchi M., Lehtonen J.Y.A., Daviet L.: Signaling Mechanism of the AT2 Angiotensin II Receptor: Crosstalk between AT1 and AT2 Receptors in Cell Growth, *Trends in Endocrinology and Metabolism*; 1999; 10: S.391-396.
- 39: Hsueh W.A., Law R.E.: Insulin Signaling in the Arterial Wall, *American Journal of Cardiology*; 1999; 84(1A): S.21J-24J.
- 40: Hsueh W.A., Law R.E., Do Y.S.: Integrins, Adhesion, and Cardiac Remodeling, *Hypertension*; 1998; 31[part 2]: S.176-180.

- 41: Ichiki T., Labosky P.A., Shiota C., Okuyama S., Imagawa Y., Fogo A., Niimura F., Ichikawa I., Hogan B.L., Inagami T.: Effects on Blood Pressure and Exploratory Behaviour of Mice Lacking Angiotensin II Type-2 Receptor, *Nature*; 1995; *377(6551)*: S.748-750.
- 42: Ignatz R.A., Massagué J.: Transforming Growth Factor-beta Stimulates the Expression of Fibronectin and Collagen and Their Incorporation into the Extracellular Matrix, *The Journal of Biological Chemistry*; 1986; *261*: S.4337-4345.
- 43: Inagami T., Eguchi S., Tsuzuki S., Ichiki T.: Angiotensin II Receptors AT1 and AT2 -- New Mechanisms of Signaling and Antagonistic Effects of AT1 and AT2, *Japanese Circulation Journal*; 1997; *61(10)*: S.807-813.
- 44: Inagami T., Guo D.F., Kitami Y.: Molecular Biology of Angiotensin II Receptors: An Overview, *Journal of Hypertension*; 1994; *12(10)*: S.S83-S94.
- 45: Inagami T., Kambayashi Y., Ichiki T., Tsuzuki S., Eguchi S., Yamakawa T.: Angiotensin Receptors: Molecular Biology and Signalling, *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*; 1999; *26*: S.544-549.
- 46: Janiak P., Pillon A., Prost J.-F., Vilaine J.-P.: Role of Angiotensin Subtype 2 Receptor in Neointima Formation After Vascular Injury, *Hypertension*; 1992; *20*: S.737-745.
- 47: Ju H., Dixon I.M.C.: Effect of Angiotensin II on Myocardial Collagen Gene Expression, *Molecular and Cellular Biochemistry*; 1996; *163/164*: S.231-237.
- 48: Kakinuma Y., Fogo A., Inagami T., Ichikawa I.: Intrarenal Localization of Angiotensin II Type 1 Receptor mRNA in the Rat, *Kidney International*; 1993; *43*: S.1229-1235.
- 49: Kambayashi Y., Bardhan S., Takahashi K., Tsuzuki S., Inui H., Hamakubo T., Inagami T.: Molecular Cloning of a Novel Angiotensin II Receptor Isoform Involved in Phosphotyrosine Phosphatase Inhibition, *Journal of Biological Chemistry*; 1993; *268(33)*: S.24543-24546.
- 50: Kamiyama K., Iguchi I., Wang X., Imanishi J.: Effects of PDGF on the Migration of Rabbit Corneal Fibroblasts and Epithelial Cells, *Cornea*; 1998; *17(3)*: S.315-325.
- 51: Kawano H., Do Y.S., Kawano Y., Starnes V., Barr M., Law R.E., Hsueh W.A.: Angiotensin II Has Multiple Profibrotic Effects in Human Cardiac Fibroblasts, *Circulation*; 2000; *101*: S.1130-1137.

- 52: Kawasaki E.S., Clark S.S., Coyne M.Y., Smith S.D., Champlin R., Witte O.N., Mc Cormick F.P.: Diagnosis of Chronic Myeloid and Acute Lymphocytic Leukemias by Detection of Leukemia-specific mRNA Sequence Amplified In Vitro, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America; 1988; 85: S.5698-5702.
- 53: Kim S., Izumi Y., Yano M., Hamaguchi A., Miura K., Yamanaka S., Miyazaki H., Iwao H.: Angiotensin Blockade Inhibits Activation of Mitogen-Activated Protein Kinases in Rat Balloon-Injured Artery, Circulation; 1998; 97: S.1731-1737.
- 54: Kinoshita T., Imamura J., Nagai H., Shimotohno K.: Quantification of Gene Expression over a Wide Range by the Polymerase Chain Reaction, Analytical Biochemistry; 1992; 206: S.231-235.
- 55: Koibuchi Y., Lee W.S., Gibbons G.H., Pratt R.E.: Role of Transforming Growth Factor-beta-1 in the Cellular Growth Response to Angiotensin II, Hypertension; 1993; 21: S.1046-1050.
- 56: Kotewicz M.L., Sampson C.M., D'Alessio J.M., Gerard G.F.: Isolation of Cloned Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase Lacking Ribonuclease H Activity, Nucleic Acid Research; 1988; 16: S.165-277.
- 57: Kupfahl C., Pink D., Friedrich K., Zurbrügg H. R., Neuss M., Warnecke C., Fielitz J., Graf K., Fleck E., Regitz-Zagrosek V.: Angiotensin II Directly Increases Transforming Growth Factor-beta-1 and Osteopontin and Indirectly Affects Collagen mRNA Expression in the Human Heart, Cardiovascular Research; 2000; 46: S.463-475.
- 58: Kurabayashi M., Yazaki Y.: Downregulation of Angiotensin II Receptor Type 1 in Heart Failure, Circulation ; 1997; 95: S.1104-1107.
- 59: Laurent G.J.: Dynamic State of Collagen: Pathways of Collagen Degradation In Vivo and their Possible Role in Regulation of Collagen Mass, American Journal of Physiology; 1987; 252: S.C1-C9.
- 60: Lee A.A., Dillmann W.H., McCulloch A.D., Villareal F.J.: Angiotensin II Stimulates the Autocrine Production of Transforming Growth Factor-beta-1 in Adult Rat Cardiac Fibroblasts, Journal of Molecular and Cellular Cardiology; 1995; 27: S.2347-2357.
- 61: Lijnen P., Petrov V.: Antagonism of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System and Collagen Metabolism in Cardiac Fibroblasts, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology; 1999; 21(3): S.215-227.

- 62: Linseman D.A., Christopher W.B., Jones D.A.: Convergence of Angiotensin II and Platelet-Derived Growth Factor Receptor Signaling Cascades in Vascular Smooth Muscle Cells, *Journal of Biological Chemistry*; 1995; 270: S.12563-12568.
- 63: Lopez J.J., Lorell B.H., Ingelfinger J.R., Weinberg E.O., Schunkert H., Diamant D., Tang S.-S.: Distribution and Function of Cardiac Angiotensin AT1- and AT2-Receptor Subtypes in Hypertrophied Rat Hearts, *American Journal of Physiology*; 1994; 267: S.H844-H852.
- 64: Masaki H., Kurihara T., Yamaki A., Inomata N., Nozawa Y., Mori Y., Murasawa S., Kizima K., Maruyama K., Horiuchi M., Dzau V.J., Takahashi H., Iwasaka T., Inada M., Matsubara H. : Cardiac-specific Overexpression of Angiotensin KK AT2 Receptor Causes Attenuated Response to AT1 Receptor-mediated Pressor and Chronotropic Effects, *Journal of Clinical Investigation*; 1998; 101(3): S.527-535.
- 65: Matsubara H.: Pathophysiological Role of Angiotensin II Type 2 Receptor in Cardiovascular and Renal Diseases, *Circulation Research*; 1998; 83: S.1182-1191.
- 66: Meffert S., Stoll M., Stecklings U.M., Bottari S.P., Unger T.: The Angiotensin II AT2 Receptor Inhibits Proliferation and Promotes Differentiation in PC12W Cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*; 1996; 122: S.59-67.
- 67: Mifune M., Sasamura H., Shimizu-Hirota R., Miyazaki H., Saruta T. : Angiotensin II Type 2 Receptors Stimulate Collagen Synthesis in Cultured Vascular Smooth Muscle Cells, *Hypertension*; 2000; 36: S.845-850.
- 68: Minol K.: Reverse-Transkriptase-PCR (RT-PCR), Hrsg.: Gassen H.G., Minol K.: Gentechnik: Einführung in Prinzipien und Methoden; 4., neubearbeitete Auflage Stuttgart; Jena, Gustav Fischer Verlag, 1996 S.296-297. 3-437-20535-8.
- 69: Morgan K., Wharton J., Webb J.C., Keogh B.E., Smith P.L., Taylor K.M., Oakley C.M., Polak J.M., Cleland J.G.: Co-Expression Of Renin-Angiotensin System Component Genes in Human Atrial Tissue, *Journal of Hypertension*; 1994; 12(4): S.S11-S19.
- 70: Mullis K.B., Faloona F.A.: Specific Synthesis of DNA In Vitro via a Polymerase-catalyzed Chain Reaction, *Methods Enzymol*; 1987; 155: S.335-350.
- 71: Muruve D.A., Barnes M.J., Stillman I.E., Libermann T.A.: Adenoviral Gene Therapy Leads to Rapid Induction of Multiple Chemokines and Acute Neutrophil-Dependent Hepatic Injury In Vivo, *Human Gene Therapy*; 1999; 10: S.965-976.

- 72: Nadal J.A., Scicli M., Carbini L.A., Nussbaum J.J., Scicli A.G.: Angiotensin II and Retinal Pericytes Migration, *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 1999; 266: S.382-385.
- 73: Nakajima M., Hutchinson H.G., Fujinaga M., Hayashida W., Morishita R., Zhang L., Horiuchi M., Pratt R.E., Dzau V.J.: The Angiotensin II Type 2 (AT₂) Receptor Antagonizes the Growth Effects of the AT₁ Receptor: Gain-Of-Function Study Using Gene Transfer, *Proceedings of the National Academy of Sciences*; 1995; 92: S.10663-10667.
- 74: Neuß M., Regitz-Zagrosek V., Hildebrandt A., Fleck E.: Isolation and Characterization of Human Cardiac Fibroblasts from Explanted Adult Hearts, *Cell and Tissue Research*; 1996; 286: S.145-153.
- 75: Newman K.D., Dunn P.F., Owens J.W., Schulick A.H., Virmani R., Sukhova G., Libby P., Dichek D.A.: Adenovirus-mediated Gene Transfer into Normal Rabbit Arteries Results in Prolonged Vascular Cell Activation, Inflammation, and Neointimal Hyperplasia, *Journal of Clinical Investigation*; 1995; 96: S.2955-2965.
- 76: Nio Y., Matsubara H., Murasawa S., Kanasaki M., Inada M.: Regulation of Gene Transcription of Angiotensin II Receptor Subtypes in Myocardial Infarction, *Journal of Clinical Investigation*; 1995; 95: S.46-54.
- 77: Nozawa Y., Haruno A., Oda N., Yamasaki Y., Matsuura N., Yamada S., Inabe K., Kimura R., Suzuki H., Hoshino T.: Angiotensin II Receptor Subtypes in Bovine and Human Ventricular Myocardium, *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 1994; 270(2): S.566-571.
- 78: Ohkubo N., Matsubara H., Nozawa Y., Mori Y., Murasawa S., Kijima K., Maruyama K., Masaki H., Tsutumi Y., Shibasaki Y., Iwasaka T., Inada M.: Angiotensin Type 2 Receptors Are Reexpressed by Cardiac Fibroblasts From Failing Myopathic Hamster Hearts and Inhibit Cell Growth and Fibrillar Collagen Metabolism, *Circulation*; 1997; 96: S.3954-3962.
- 79: Peach MJ: Renin-Angiotensin System: Biochemistry and Mechanisms of Action, *Physiological Reviews*; 1977; 57(2): S.1977.
- 80: Postlethwaite A.E., Snyderman R., Kang A.H.: The Chemotactic Attraction of Human Fibroblasts to a Lymphocyte-Derived Factor, *The Journal of Experimental Medicine*; 1976; 144: S.1188-1203.

- 81: Regitz-Zagrosek V., Fielitz J., Fleck E.: Myocardial Angiotensin Receptors in Human Hearts, *Basic Research in Cardiology*; 1998; *93, Suppl. 2*: S.37-42.
- 82: Regitz-Zagrosek V., Friedel N., Heymann A., Bauer P., Neuß M., Rolfs A., Steffen C., Hildebrandt A., Hetzer R., Fleck E.: Regulation, Chamber Localization, and Subtype Distribution of Angiotensin II Receptors in Human Hearts, *Circulation*; 1995; *91*: S.1461-1471.
- 83: Regitz-Zagrosek V., Neuß M., Holzmeister J., Warnecke C., Fleck E.: Molecular Biology of Angiotensin Receptors and Their Role in Human Cardiovascular Disease, *Journal of Molecular Medicine*; 1996; *74*: S.233-251.
- 84: Rogg H., de Gasparo M., Graedel E., Stulz P., Burkhart F., Eberhard M., Erne P.: Angiotensin II-Receptor Subtypes in Human Atria and Evidence for Alterations in Patients with Cardiac Dysfunction, *European Heart Journal*; 1996; *17*: S.1112-1120.
- 85: Schaub M.C., Hefti M.A., Zuellig R.A., Morano I.: Modulation of Contractility in Human Cardiac Hypertrophy by Myosin Essential Light Chain Isoforms, *Cardiovascular Research*; 1998; *37*: S.381-404.
- 86: Schelling P., Fischer H., Ganten D.: Angiotensin and Cell Growth: A Link to Cardiovascular Hypertrophy?, *Journal of Hypertension*; 1991; *9(1)*: S.3-15.
- 87: Schnee J.M., Hsueh W.A.: Angiotensin II, Adhesion, and Cardiac Fibrosis, *Cardiovascular Research*; 2000; *46*: S.264-268.
- 88: Schor S.L., Ellis I., Dolman C., Banyard J., Humphries M.J., Mosher D.F., Grey A.M., Mould A.P., Sottile J., Schor A.M. : Substratum-dependent Stimulation of Fibroblast Migration by the Gelatin-binding Domain of Fibronectin, *Journal of Cell Science*; 1996; *109*: S.2581-2590.
- 89: Schorb W., Peeler T.C., Madigan N.N., Conrad K.M., Baker K.M.: Angiotensin II-Induced Protein Tyrosine Phosphorylation in Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts, *Journal of Biological Chemistry*; 1994; *269(30)*: S.19626-19632.
- 90: Schorb W., Booz G.W., Dostal D.E., Conrad K.M., Chang K.C., Baker K.M.: Angiotensin II is Mitogenic in Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts, *Circulation Research*; 1993; *72*: S.1245-1254.

- 91: Schorb W., Conrad K.M., Singer H.A., Dostal D.E., Baker K.M.: Angiotensin II Is a Potent Stimulator of MAP-Kinase Activity in Neonatal Rat Cardiac Fibroblasts, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*; 1995; 27(5): S.1151-1160.
- 92: Schütz S., Le Moullec J.-M., Corvol P., Gasc J.-M.: Early Expression of All the Components of the Renin-Angiotensin-System in Human Development, *American Journal of Pathology*; 1996; 149: S.2067-2079.
- 93: Sechi L.A., Grady E.F., Griffin C.A., Kalinyak J.E., Schambelan M.: Distribution of Angiotensin II Receptor Subtypes in Rat and Human Kidney, *American Journal of Physiology*; 1992; 262: S.F236-F240.
- 94: Senbonmatsu T., Ichihara S., Price E. Jr., Gaffney F.A., Inagami T.: Evidence for Angiotensin II Type 2 Receptor-mediated Cardiac Myocyte Enlargement During In Vivo Pressure Overload, *The Journal of Clinical Investigation*; 2000; 106: S.R25-R29.
- 95: Seppä H., Grotendorst G., Seppä S., Schiffmann E., Martin G.R.: Platelet-Derived Growth Factor Is Chemotactic for Fibroblasts, *The Journal of Cell Biology*; 1982; 92: S.584-588.
- 96: Sheetz M.P., Felsenfeld D.P., Galbraith C.G.: Cell Migration: Regulation of Force On Extracellular-Matrix-Integrin Complex, *Cell Biology*; 1998; 8: S.51-54.
- 97: Sil S., Sen S.: Angiotensin II and Myocyte Growth: Role of Fibroblasts, *Hypertension*; 1997; 30(2 Pt 1): S.209-216.
- 98: Siwik D.A., Chang D. L.-F., Colucci W.S.: Interleukin-1-beta and Tumor Necrosis Factor-alpha Decrease Collagen Synthesis and Increase Matrix Metalloproteinase Activity in Cardiac Fibroblasts In Vitro, *Circulation Research*; 2000; 86: S.1259-1265.
- 99: Soma Y., Takehara K., Ishibashi Y.: Alteration of the Chemotactic Response of Human Skin Fibroblasts to PDGF by Groth Factors, *Experimental Cell Research*; 1994; 212: S.274-277.
- 100: Stoll M., Stecklings M., Paul M., Bottari S.P., Metzger R., Unger T.: The Angiotensin AT2-Receptor Mediates Inhibition of Cell Proliferation in Coronary Endothelial Cells, *Journal Of Clinical Investigation*; 1995; 95: S.651-657.
- 101: Suzuki J., Matsubara H., Urakami M., Inada M.: Rat Angiotensin II (Type 1A) Receptor mRNA Regulation and Subtype Expression in Myocardial Growth and Hypertrophy, *Circulation Research*; 1993; 73: S.439-447.

- 102: Tanaka M., Tsuchida S., Imai T., Fujii N., Miyazaki H., Ichiki T., Naruse M., Inagami T.: Vascular Response to Angiotensin II Is Exaggerated through an Upregulation of AT1 Receptor in AT2 Knockout Mice , Biochemical and Biophysical Research Communications; 1999; 258: S.194-198.
- 103: Timmermans P.B.M.W.M., Wong P.C., Chiu A.T., Herblin W.F., Benfield P., Carini D.J., Lee R.J., Wexler R.R., Saye J.A., Smith R.D. : Angiotensin II Receptors and Angiotensin II Receptor Antagonists, Pharmacological Reviews; 1993; 45 No. 2: S.205-251.
- 104: Tsutsumi Y., Matsubara H., Ohkubo N., Mori Y., Nozawa Y., Murasawa S., Kijima K., Maruyama K., Masaki H., Moriguchi Y., Shibasaki Y., Kamihata H., Inada M., Iwasaka T.: Angiotensin II Type 2 Receptor Is Upregulated in Human Heart With Interstitial Fibrosis, and Cardiac Fibroblasts are the Major Cell Type for Its Expression, Circulation Research; 1998; 83: S.1035-1046.
- 105: Unger T., Chung O., Csikos T., Culman J., Galliant S., Gohlke P., Hohle S., Meffert S., Stoll M., Stroth U., Zhu Y.Z.: Agiotensin Receptors, Journal of Hypertension; 1996; 14(5): S.S95-S103.
- 106: Villareal F.J., Kim N.N., Ungab G.D., Printz M.P., Dillmann W.H.: Identification of Functional Angiotensin II Receptors on Rat Cardiac Fibroblasts, Circulation; 1993; 88: S.2845-2861.
- 107: Viswanathan M., Saavedra J.M.: Expression of Angiotensin II AT2 Receptors in the Rat Skin during Experimental Wound Healing, Peptides; 1992; 13(4): S.783-786.
- 108: Wang X., Nickenig G., Murphy T.J.: The Vascular Smooth Muscle Type I Angiotensin II Receptor mRNA Is Destabilized by Cyclic AMP-Elevating Agents, Molecular Pharmacology; 1997; 52: S.781-787.
- 109: Wang Z.-Q., Moore A.F., Ozono R., Siragy H.M., Carey R.M.: Immunolocalization of Subtype 2 Angiotensin II (AT2) Receptor Protein in Rat Heart, Hypertension; 1998; 32: S.78-83.
- 110: Weir M.R., Dzau V.J.: The Renin-Angiotensin-Aldosterone System: A Specific Target for Hypertension Management, American Journal of Hypertension; 1999; 12: S.205S-213S.
- 111: Wharton J., Morgan K., Rutherford R.A., Catravas J.D., Chester A., Whitehead B.F., De Leval M.R., Yacoub M.H., Polak J.M.: Differential Distribution of Angiotensin AT2

Receptors in the Normal and Failing Human Heart, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*; 1998; 284: S.323-336.

- 112: Xi X.P., Graf K., Goetze S., Fleck E., Hsueh W.A., Law R.E.: Central Role of The MAPK pathway in Ang II-Mediated DNA Synthesis and Migration in Rat Vascular Smooth Muscle Cells, *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*; 1999; 19(1): S.73-82.
- 113: Yamada T., Horiuchi M., Dzau V.J.: Angiotensin II Type 2 Receptor Mediates Programmed Cell Death, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*; 1996; 93: S.165-160.

Materialien und Geräte

Chemikalien:

[¹²⁵ I]-(Sar1, Ile8)-Angiotensin II	ANAWA via Biotrend Chemikalien	Deutschland
5-Chlor-4-Brom-indolyl-β-D-galactosid, X-Gal	MBI Fermentas	Deutschland
Agar Noble	Difco Laboratories	Deutschland
Albumin Bovine Fraktion V Solution	Sigma	Deutschland
Aminoethyl Carbazole Substate Kit	Zymed Laboratories via Zytomed	Deutschland
Angiotensin II	Sigma	Deutschland
Anti-Vimentin-Antikörper	Zymed Laboratories via Zytomed	Deutschland
Anti-von Willebrand Faktor-Antikörper	Dako Diagnostica	Deutschland
Aqua B. Braun	B. Braun	Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Sigma	Deutschland
CGP421112	Bachem	Deutschland
Chloroform, CHCl ₃	Merck	Deutschland
Collagen I	Sigma	Deutschland
Collagenase	Boehringer Mannheim	Deutschland
Combi Pol Kit:	Gibco BRL, Life Technologies	Deutschland
- Optiform Combi Pol Puffer, 10 x		
- Magnesiumchlorid, MgCl ₂		
- Desoxyribonucleotidtriphosphate, dNTP		
- Taq Polymerase		
Diethyl Pyrocarbonate, DEPC	Sigma	Deutschland
Dispase	Gibco BRL, Life Technologies	Deutschland
DMEM	PAA-Laboratories	Deutschland
EDTA	Merck	Deutschland
Ethanol, EtOH	Carl Roth	Deutschland
Ethidiumbromid	Sigma	Deutschland
Ferricyanid	Sigma	Deutschland
Ferrocyanid	Sigma	Deutschland
Fetal Calf Serum, FKS	PAA-Laboratories	Deutschland

RT-Kit:	Gibco BRL, Life Technologies	Deutschland
- First Strand Buffer, 5x		
- Desoxyribonucleotidtriphosphate, dNTP, 2,5 je mM		
- Random Hexamers (RH), 50 µM		
- Dithiothreitol, DTT, 100 mM		
- RNaseOut		
- SuperScript™ II Reverse Transcriptase		
Formaldehyd	Sigma	Deutschland
Gelatine	Merck	Deutschland
GeneRuler™ 100bp DNA Ladder	MBI Fermentas	Deutschland
Glutaraldehyd	Sigma	Deutschland
Guanidiniumisocyanat, GuSCN	Sigma	Deutschland
Hepes Buffer Solution	PAA-Laboratories	Deutschland
Human platelet-derived growth factor-BB, hPDGF-BB	BioSource	Deutschland
Irbesartan	Bristol Myers Squibb	Deutschland
Isoamylalkohol	Merck	Deutschland
Isopropanol	Merck	Deutschland
Kalziumchlorid, CaCl ₂	Merck	Deutschland
Krebs-Henseleit Puffer, KHB	Sigma	Deutschland
L-Glutamin	PAA-Laboratories	Deutschland
Loading-Dye Solution (6 x)	MBI Fermentas	Deutschland
Magnesiumchlorid, MgCl ₂	Gibco BRL, Life Technologies	Deutschland
Mayers Hämalaunlösung	Merck	Deutschland
Methanol	Merck	Deutschland
Monoclonal Anti-Vimentin-Antikörper	Beckman Coulter	Deutschland
Natriumacetat, NaOAc	Sigma	Deutschland
Natriumchlorid, NaCl	Merck	Deutschland
Natriumcitrat	Sigma	Deutschland
Natriumhydrogencarbonat, CHNaO ₃	Merck	Deutschland
Natronlauge, NaOH	Merck	Deutschland

N-Lauryl-Sarcosin	Sigma	Deutschland
Paraformaldehyd	Sigma	Deutschland
PBS, Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, ohne Kalzium- und Magnesiumionen	PAA-Laboratories	Deutschland
PD123319	Research Biochemicals International via Sigma	Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAA-Laboratories	Deutschland
Phenol	Carl Roth	Deutschland
Primer forward, reverse	Invitek	Deutschland
RNasin	MBI Fermentas	Deutschland
Salzsäure, HCl	Merck	Deutschland
Sarcosyl	Sigma	Deutschland
Sodium dodecyl sulfate, SDS, Laurylsulfat	Merck	Deutschland
Tris-acetat EDTA-Puffer, TAE-Puffer	Gibco BRL, Life Technologies	Deutschland
Tris-Base	Merck	Deutschland
Trypsin EDTA (1x)	Gibco BRL, Life Technologies	Deutschland
Wasser	B. Braun	Deutschland
ZymedR LAB-SA System	Zymed Laboratories via Zytomed	Deutschland

Verbrauchsmaterial:

Eppendorfgefäße, 2ml	Eppendorf-Netheler-Hinz	Deutschland
Eppendorf-Reaktionstube	Heraeus Instruments	Deutschland
Falcon 24-Lochplatte	Beckton Dickinson	USA
Falcon-Röhrchen, („conical tube“), 15 ml	Beckton Dickinson	USA
Falcon-Röhrchen, („conical tube“), 50 ml	Beckton Dickinson	USA
Falcon-Zellkulturschalen	Beckton Dickinson	USA
Objektträgerkammern, („chamber slides“)	Nunc via Merck	Deutschland
Zellkultureinsätze (Migrationskammern)	Beckton Dickinson	USA

Geräte:

Biometra ^R Bio Doc CCD-Camera	Biomedizinische Analytik	Deutschland
Biometra ^R Bio DocII TM Hard- und Software	Biomedizinische Analytik	Deutschland

Biometra ^R Transluminator TI3, UV-Lichtquelle	Biomedizinische Analytik	Deutschland
Brutschrank	Heraeus Instruments	Deutschland
Eppendorf Centrifuge 5417 R	Heraeus Instruments	Deutschland
Gelkammer	Life Technologies	Deutschland
LaminAirflow	Heraeus Instruments	Deutschland
Megafuge 1.0 R, Zentrifuge	Heraeus Instruments	Deutschland
Neubauer Zählkammer	Brand	Deutschland
Quantifizierungscomputerprogramm TINA 2.0	Raytest	Deutschland
Wallac Wizard Counter, Phosphoimager	Wallace	Kanada
PTC-100TM Programmable Thermal Controller	MJ Research	USA
Ultrospect 2000	Pharmacia Biotech	England
Wasserbad	Memmert	Deutschland
Waters Alliance-Anlage SI 109/6	Waters	Deutschland
Zeiss Axiovert S100	Zeiss	Deutschland

Danksagung

Frau Prof. Dr. V. Regitz-Zagrosek danke ich für die freundliche Überlassung des Themas und der Mittel für die vorliegende Arbeit. Ich danke ihr sehr für die gute Betreuung während der Laborarbeit. Sie hatte immer ein offenes Ohr für meine Fragen und hat den Fortgang der Arbeit entscheidend gefördert.

Frau Dr. Ch. Warnecke danke ich sehr herzlich. Sie war in jeder Phase der Arbeit meine erste Ansprechpartnerin und hatte für jedes Problem die richtige Lösung. Sie hat mich mit viel Geduld in allen Phasen der Arbeit unterstützt. Von ihr habe ich viel gelernt.

Frau Dr. J. Erdmann, Frau B. Wollert-Wulf, Frau H. Kallisch, Frau B. Hannack und Herrn Dipl. Ing. B. Krüdwagen danke ich herzlich. Sie waren mir bei technischen Problemen mit ihren fundierten Kenntnissen oft sehr hilfreich und sorgten für eine angenehme Arbeitsatmosphäre.

Herrn Dr. D. Brümmer und Herrn Dr. F. Schäper danke herzlich ich für die technische Hilfe bei den mikroskopischen Aufnahmen.

Meinen Eltern danke ich sehr für die verlässliche und langjährige Unterstützung während des Studiums und für die vorliegende Arbeit.

Weiterhin danke ich C. Suhr, A. Bungenstock, K. Kappert, D. Pink und C. Kupfahl für die gute Zusammenarbeit im Labor.

Jannie, Jan C. und Andrea, Elmar, Sarah, Anne-Katrin, Lars, Christian, Sabine, Silke und Beata bin ich sehr dankbar für die gute Unterstützung außerhalb des Labors.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides Statt, dass die vorliegende Dissertation von mir selbst und ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

(Daniel Kaup)